



**(Filiación Institucional de acuerdo a la Res. HCS 1125-17)**

**Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Instituto de Biología Celular. Córdoba. Argentina**

# **Estudio de la expresión y características biológicas de fenotipos inducidos *in vitro* de neutrófilos humanos**

Tesis para optar por el Título de Doctor en Medicina y Cirugía

Autor: Fernando Marcos Rodríguez

Correo electrónico: [frodriguez@fcm.unc.edu.ar](mailto:frodriguez@fcm.unc.edu.ar)

Directora: Prof. Dra. Ivón Teresa Clara Novak

Fecha: 24/05/2019



Estudio de la expresión y características biológicas de fenotipos inducidos *in vitro* de neutrófilos humanos por Fernando Marcos Rodriguez se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## **Comisión de Seguimiento de Tesis**

**Directora: Prof. Dra. Ivón T. C. Novak**

**Integrantes: Prof. Dr. Rodolfo E. Ávila**

**Prof. Dra. Silvia V. Nates**

**Instituto de Biología Celular  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Córdoba**

**RHCD FCM 401/14**

**Art. 30. del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía.**

**LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS  
OPINIONES DE ESTA TESIS**

## **Dedicatoria**

*A la memoria de mi padre.  
A mi madre Angela,  
mis hermanos  
Karen, Alejandro,  
Ileana y Gabriel  
por apoyarme  
en todo momento.  
A mi sobrina Denise.  
A Federico,  
por su compañía.*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi Directora de Tesis, Prof. Dra. Ivón T. C. Novak, por su dirección y sus enseñanzas en el campo de la investigación, por ser mi profesora, por su paciencia, por su tiempo, por transmitirme su amor por la docencia y el estudio de la Inmunología, por su apoyo en los momentos gratos y difíciles... por demostrarme que siempre los sueños, se pueden volver realidad.

A los miembros de la Comisión de Seguimiento, Prof. Dr. Rodolfo Ávila y Prof. Dra. Silvia Nates por sus aportes y guía.

A los pacientes anónimos, que desinteresadamente donaron muestras.

Al personal del Banco de Sangre del Instituto de Hematología y Hemoterapia de la UNC, por su gentil colaboración.

A los integrantes del Instituto de Biología Celular y el Centro de Microscopia Electrónica que me ayudaron en procedimientos técnicos.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	12
Características del citoplasma de los PMN neutrófilos	15
Membrana plasmática de los PMN neutrófilos	16
Ontogenia de los PMN neutrófilos	19
Mecanismos funcionales de los PMN neutrófilos: Fagocitosis Degranulación Estallido respiratorio Formación de NETs	20
Interacciones relevantes: PMN neutrófilos y plaquetas PMN neutrófilos y macrófagos PMN neutrófilos y células T	30
Procesamiento y presentación de antígenos	32
Sinapsis inmunológica	33
Activación de células T y moléculas coestimuladoras	35
Antecedentes sobre PMN neutrófilos como CPA	36
Hipótesis	38
Objetivos	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	88
PERSPECTIVAS	92
BIBLIOGRAFÍA	93
PUBLICACIONES DERIVADAS	108

## Abreviaturas

Ac: anticuerpo	Fas: ligando de FasL
ADN: ácido desoxirribonucleico	Fc $\alpha$ R: receptor para el fragmento Fc de la IgA
Ag: antígeno	Fc $\gamma$ R: receptor para el fragmento Fc de la IgG
AR: artritis reumatoide	Fc $\epsilon$ R: receptor para el fragmento Fc de la IgE
BLT: receptor de leucotrieno	FITC: isotiocianato de fluoresceína
C: Complemento	fMLP: péptidos formilados
CD: Cluster of Differentiation (grupo de diferenciación, molécula marcadora).	FPR: receptor para péptidos formilados
CD14: ligando de LPS	G-CSF: factor estimulante de colonias granulocito
CD4: molécula co-receptora marcadora de subtipo de linfocito T colaborador	G-CSFR: receptor para el factor estimulante de colonias granulocito
CD66 molécula de PMN neutrófilos	GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocito-macrófago
CD8: molécula co-receptora marcadora de subtipo de linfocito T citotóxico	GM-CSFR: receptor para el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago
CLEC-2: receptor 2 simil lectina tipo C	GPIb: complejo de glicoproteína de la membrana plaquetaria
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC en Inglés).	HAI: hemoaglutinación indirecta
CPA : Célula presentadora de antígeno.	HBc: antígeno core del virus de la hepatitis B
CR: receptor del Complemento	HBs: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
c-SMAC: complejo de activación supramolecular central	HCV: virus de la hepatitis C
CTLA-4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico	HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
CXC/CC: quimioquinas	HLA-DR/DP/DQ: moléculas Clase II del CMH.
CXCR/CCR: receptores de quimioquinas	HMGB1: proteína de grupo de alta movilidad
DAPI: 4,6' diamino-2-fenilindol	HTLV: virus linfotrópico humano de células T
d-SMAC: complejo de activación supramolecular distal	ICAM: molécula de adhesión intercelular
EIE: enzimoimmunoensayo	IFN $\alpha$ : interferón alfa
EN: elastasa del neutrófilo	IFN $\beta$ : interferón beta
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica	IFN $\gamma$ : interferón gamma
ET: trampa extracelular	IFNAR: receptor para interferón alfa
	IFNGR: receptor para interferón gamma

IL-n: interleuquina n  
 IRO/ROS: intermediarios reactivos del oxígeno  
 LES: lupus eritematoso sistémico  
 LFA-1 ( $\alpha_1\beta_2$ ; CD11a/CD18): antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos  
 LPS: lipolisacárido  
 LT $\beta$ R: receptor de linfotoxina beta  
 M1: macrófago clásicamente activado  
 M2: macrófago activado alternativamente  
 Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ; CD11b/CD18): antígeno macrófago-1  
 Mcl: receptor lectina tipo C de macrófago  
 MD-2: antígeno linfocítico 96, ligando de LPS  
 MDA5: receptor intracelular del factor asociado a la diferenciación del melanoma  
 MDL-1: receptor mieloides DAP12 que se asocia a lectina  
 MET: microscopia electrónica de transmisión  
 Mincle: receptor de lectina tipo C inducible por macrófagos  
 MN: leucocito mononuclear  
 MO: microscopia óptica  
 MPO: mieloperoxidasa  
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
 NET: trampa extracelular neutrófila  
 NGAL: lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos  
 NK: célula asesina natural  
 NKT: célula T asesina natural  
 NLRP: receptor con dominio de oligomerización y unión a nucleótido  
 NOD: receptor de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos  
 NOX/Duox: isoformas de NADPH  
 OVA: ovoalbúmina  
 PAD4: peptidilarginina deiminasa 4  
 PAFR: factor receptor de plaquetas  
 PD-1: proteína de muerte celular programada 1  
 PE: ficoeritrina  
 PMA: ácido forbol mirístico  
 PMAP: patrones moleculares asociados a patógenos  
 PMN: leucocito polimorfonuclear neutrófilo  
 PR3: proteinasa 3  
 PSGL-1: P-selectina glicoproteína ligando  
 p-SMAC: complejo de activación supramolecular periférico  
 Raf-MEK-ERK: proteínas quinasas activadas por mitógenos  
 RANK: receptor activador del factor nuclear kB  
 RIG-I: receptor intracelular del gen inducible por el ácido retinoico  
 RMLs: Rosetas Macrófago Linfocitarias  
 ROS: especies reactivas del oxígeno  
 RRP: receptores de reconocimiento de patrones  
 SD: desvío standard  
 SI: sinapsis inmunológica  
 SNARE: receptores de proteínas de fijación soluble de NSF  
 SR: scavenger receptor  
 TCR: T Cell Receptor, Receptor de Célula T  
 TGF  $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta  
 Th: perfil colaborador de célula T  
 TLR: receptores tipo Toll  
 TNF: factor de necrosis tumoral  
 TNFR: receptores para factor de necrosis tumoral  
 TRAIL-R: receptor de muerte celular  
 VDRL: Venereal Disease Research Lab, prueba inespecífica para sífilis  
 VLA-4: antígeno muy tardío 4



## RESUMEN

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) desempeñan un rol clave en la inmunidad innata frente a infecciones especialmente bacterianas y fúngicas, pero en la actualidad estos leucocitos por su potencial versatilidad en cuanto a sus funciones, han sido propuestos como células moduladoras de la inmunidad adaptativa. Se han descrito algunos PMN neutrófilos en sitios de inflamación que expresan fenotipo de célula presentadora de antígenos (CPA) —se consideran a las moléculas B7 (B7-1, CD80 y B7-2, CD86) y a CMH clase II (HLA-DR) como marcadoras del fenotipo CPA de PMN neutrófilo— y este aspecto constituye un área de interés científico y ha motivado este trabajo de investigación científica. El objetivo de esta Tesis es el estudio de la expresión y características biológicas de fenotipos inducidos *in vitro* de PMN neutrófilos humanos. Materiales y métodos: En las muestras se realizaron ensayos con estimuladores clásicos y con uno no clásico para generar los fenotipos. La expresión de moléculas de los diferentes fenotipos y la liberación de trampas extracelulares neutrófilas (NETs) se evidenciaron mediante inmunofluorescencia. Las observaciones de interacciones celulares de contacto se realizaron mediante microscopía óptica y electrónica. Los fenotipos inducidos *in vitro* con estimuladores surgen de la comparación con el “fenotipo PMN neutrófilo control” de las muestras apareadas sin estimulación. Para el desarrollo del trabajo se utilizaron muestras donadas por el Banco de Sangre del Instituto de Hematología de la UNC, en anonimato, con consentimiento informado y aprobación del proyecto por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas, FCM, UNC, registro 169/13.

Resultados: se observaron las siguientes características del fenotipo inducido *in vitro* de “PMN neutrófilo-CPA”. a) expresa en superficie las moléculas HLA-DR (CMH) y moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86); b) presenta una vida media en cultivo que varía según los activadores (con LPS: 48 hs, con OVA: 60 hs); c) es capaz de generar NETs con activadores clásicos (LPSy fMLP) y no clásico (OVA); d) las NETs pueden contener moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86); e) las NETs que contienen moléculas coestimuladoras promueven aumento de sinapsis inmunes. Por otro lado, se evidenciaron las siguientes características del fenotipo inducido *in vitro* de “PMN neutrófilo CD4-CD45RO”: a) expresa en superficie las moléculas CD4 y CD45RO; b) presenta una vida media en cultivo de 30 minutos con los activadores LPS, fMLP y OVA; c) es capaz de generar NETs con activadores clásicos y

uno no clásico; d) las NETs pueden contener moléculas CD4 y CD45RO. Conclusiones: Se considera que el desarrollo de este trabajo científico aporta nuevos datos sobre las importantes funciones inmunológicas que llevan a cabo las células implicadas. Los hallazgos con respecto a la expresión de moléculas características de las CPAs profesionales en PMN neutrófilos, permiten definirlos como potenciales CPAs. En este estudio sobre la expresión y características biológicas de fenotipos de PMN neutrófilos inducidos *in vitro* se halló la expresión de moléculas coestimuladoras B7 y del CMH II: HLA-DR en las NETs lo que otorga una nueva perspectiva a las trampas extracelulares influenciando en el entorno celular y adquiere gran importancia por la posibilidad de ruptura de la autotolerancia, tal como sucede en enfermedades autoinmunes. Estos resultados pueden ser tenidos en cuenta como posibles blancos terapéuticos. Además, por otra parte, el hallazgo de la expresión de moléculas no convencionales del fenotipo PMN neutrófilo-CD4, CD45RO y la liberación de NETs conteniendo dichas moléculas pueden sentar las bases de futuras investigaciones donde se evalúe su significado funcional. Esto tiene interés por ejemplo en el estudio de la infección por HIV ya que podría influir en la biodistribución del mismo, siendo CD4 el receptor primario de este virus. La posibilidad de los PMN neutrófilos que en determinadas condiciones desempeñen roles de CPA comprometiendo la vía de coestimulación B7-1 (CD80) / B7-2 (CD86): CD28 – CTLA 4 en las diferentes subpoblaciones de células T tendría importancia en la inmunoregulación y la patogénesis de diversas enfermedades donde las NETs también pueden estar implicadas.

## **ABSTRACT**

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) play a key role in innate immunity especially against bacterial and fungal infections, but at present these leukocytes, because of their potential versatility in their functions, have been proposed as modulators of adaptive immunity. Some PMN neutrophils have been described at sites of inflammation that express antigen-presenting cell (APC) phenotype —B7 molecules (B7-1, CD80 and B7-2, CD86) and MHC class II (HLA-DR) are considered as markers of the PMN neutrophil APC phenotype— and this aspect constitutes an area of scientific interest and has motivated this scientific research work. The objective of this thesis is the study of the expression and biological characteristics of phenotypes induced in vitro of human PMN neutrophils. Material and methods: In the samples, tests were performed with classic stimulators and with one non-classical stimulator to generate the phenotypes. The expression of molecules of the different phenotypes and the release of extracellular neutrophil traps (NETs) were evidenced by immunofluorescence. The observations of cellular contact interactions were made by optical and electronic microscopy. The phenotypes induced in vitro with stimulators arise from the comparison with the "control PMN neutrophil phenotype" of paired samples without stimulation. To the development of this investigation the samples were donated by the Blood Bank of the Hematology Institute of the UNC, in anonymity, with serology data, with informed consent with approval by the Ethics Committee of the Hospital Nacional de Clínicas, FCM, UNC, record 169/13.

Results: the following characteristics of the in vitro induced phenotype of "PMN neutrophil-APC" were observed. a) They express on the surface the HLA-DR molecules (MHC) and costimulatory B7 molecules (CD80 and CD86); b) They have a half-life in culture that varies according to the activators (with LPS: 48 hours, with OVA: 60 hours); c) They are capable of generate NETs with classic (LPSy fMLP) and non-classical (OVA) activators; d) NETs may contain costimulatory B7 molecules (CD80 and CD86); e) NETs that contain costimulatory molecules promote an increase in immune synapses. On the other hand, the following characteristics of the in vitro induced phenotype of "PMN neutrophil CD4-CD45RO" were evidenced: a) They express on the surface the CD4 and CD45RO molecules; b) They have a half-life in culture of 30 minutes with LPS, fMLP and OVA activators; c) They are capable of generate NETs with classical activators and one non-classical activator; d) NETs may contain CD4 and CD45RO molecules. Conclusions: It is considered that the development of this scientific

work provides new data on the important immunological functions carried out by the involved cells. The findings regarding the expression of characteristic molecules of professional APCs in PMN neutrophils allow us to define them as potential APCs. In this study on the expression and biological characteristics of PMN neutrophil phenotypes induced in vitro, we found the expression of costimulatory molecules B7 and CMH II: HLA-DR in NETs which gives a new perspective to extracellular traps influencing the cellular environment and it acquires great importance because of the possibility of rupture of self-tolerance, as it happens in autoimmune diseases. These results can be taken into account as possible therapeutic targets. In addition, on the other hand, the finding of the expression of non-conventional molecules of PMN neutrophil-CD4, CD45RO phenotype, and the release of NETs containing these molecules can lay the foundations for future investigations where their functional significance is evaluated. This is of interest, for example, in the study of HIV infection since it could influence its biodistribution, with CD4 being the primary receptor for this virus. The possibility of PMN neutrophils that under certain conditions play roles of APC compromising the costimulation pathway B7-1 (CD80) / B7-2 (CD86): CD28-CTLA 4 in the different subpopulations of T cells would be important in immunoregulation and the pathogenesis of various diseases where NETs may also be involved.

## **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) actualmente se hallan en la mira de la Inmunología ya que recientemente se ha postulado que estas células participan en un papel clave en los mecanismos efectores y reguladores de las respuestas innatas y adaptativas (1-3).

Los leucocitos se clasifican en dos grupos generales teniendo en cuenta la presencia de gránulos específicos en su citoplasma: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y agranulocitos (linfocitos y monocitos). Los PMN neutrófilos representan el mayor número de leucocitos circulantes en sangre periférica y son los granulocitos más comunes, constituyendo el 40-60% de la población de glóbulos blancos (4). Son células móviles que abandonan la circulación y migran hacia el tejido conjuntivo. Como primera línea de defensa en contra de patógenos, este número no es estático, sino que puede incrementarse rápidamente y movilizarse al sitio de infección (5). Este rol clave, se evidencia cuando el PMN neutrófilo falla en sus funciones, produciéndose desde inmunodeficiencias a enfermedades sistémicas severas como la sepsis (1).

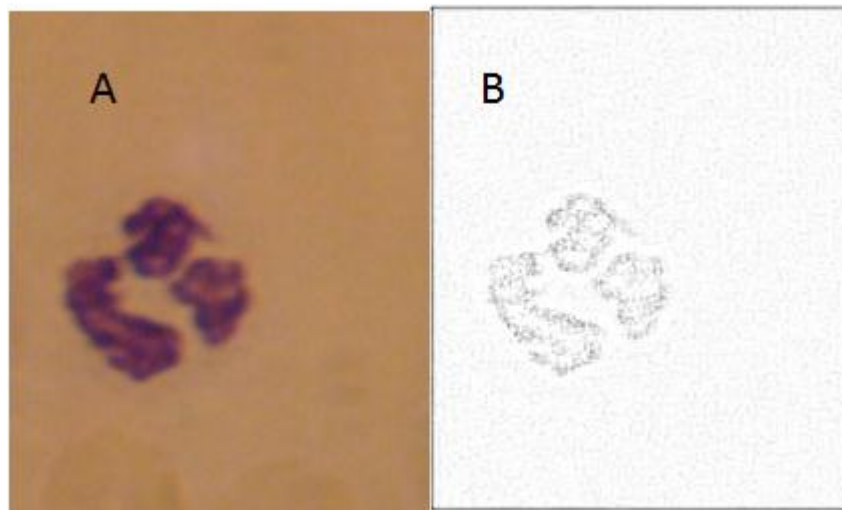
Los PMN son llamados polimorfonucleares porque morfológicamente se caracterizan por su núcleo multilobulado (de tres a cinco lóbulos) que se encuentran unidos por delgados puentes cromatínicos (6) (Figura 1). Se ha propuesto que la composición proteica de la envoltura nuclear de los PMN neutrófilos les permite la "deformabilidad" de su núcleo y facilitaría la migración de las células activadas de los vasos a los sitios de infección y también la lobulación y las formas en anillo (7,8). La existencia de PMN neutrófilo murino con núcleo en forma de anillo se conoce desde hace mucho tiempo, pero en neutrófilos humanos el núcleo en anillo se observó en 1987 en pacientes chagásicos e individuos sanos (9,10). Los núcleos en forma en anillo en los PMN neutrófilos están compuestos por tres o cuatro áreas lobuladas completamente conectadas entre sí, algunas de ellas por una delgada tira de ADN. Se propuso que el gran número (aproximadamente el 15%) de estas células en la sangre periférica sugería que pueden ser una etapa evolutiva normal en el desarrollo de los PMN neutrófilos humanos (9,10). Además, en algunas patologías, como la mononucleosis infecciosa, los síndromes mielodisplásicos y otras, también se observaron núcleos en forma en anillo en neutrófilos humanos (11-18).

Estas células tienen gran importancia frente a infecciones bacterianas y fúngicas, ya que por su amplia variedad de receptores innatos, son capaces de reconocer diversos *patrones*

*moleculares asociados a patógenos (PMAP)*. Dicho reconocimiento les permite realizar fagocitosis, y destruir patógenos mediante mecanismos citotóxicos que no dependen de oxígeno liberando poderosas enzimas hidrolíticas (*degranulación*) o bien mediante mecanismos dependientes de oxígeno ("*estallido respiratorio*") y también mediante la liberación de *trampas extracelulares neutrófilas (NETs)*. Dichos mecanismos funcionales del PMN serán descritos más adelante.

Desde su descubrimiento por Paul Elrich en 1900 según cita Diz Dios *et al.* (19), la mera caracterización del PMN neutrófilo como fagocito ha quedado relegada y en la actualidad, a esta versátil célula se le han atribuido funciones inmunomoduladoras, en relación a la posible existencia de diversos fenotipos que ejercen su acción según el microambiente donde se encuentren y según la amplia interacción que desarrollen con todo el repertorio de células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa (2,3).

El concepto de poblaciones heterogéneas de neutrófilos ha sido planteado ya hace varios años (20), pero recientemente es que ha emergido la descripción de estas poblaciones abarcando PMN neutrófilos maduros, inmaduros y en situaciones de salud y enfermedad (1,21,22).



**Figura 1. Imagen de núcleo de un PMN neutrófilo humano. A.** microfotografía de extendido de cultivo celular teñido con Hematoxilina. 1000x. **B.** Dibujo del contorno nuclear. (Paint.NET v3.31). Se observa el núcleo polilobulado con delgados puentes cromatínicos.

## Características del citoplasma de los PMN neutrófilos

El citoplasma neutrofílico se halla cubierto por un gran número de gránulos y vesículas secretoras que permite caracterizarlos como leucocitos “*granulocitos*”.

Estudios en PMN neutrófilos de conejo han permitido clasificar los gránulos en *primarios* o *azurófilos*, *secundarios* o *específicos*, *terciarios* o *de gelatinasa*; pero en humanos, esta clasificación es poco clara (23). De todas formas, algunos autores describen la existencia de gránulos *primarios* (lisosomas) que contienen enzimas hidrolíticas y mieloperoxidasa (MPO) y elastasa (EN), gránulos *secundarios* que contienen altos niveles de lactoferrina, gránulos *terciarios* que contienen metaloproteinasas y recientemente describen una cuarta población de gránulos ricos en lectina microbiana ficolina-1 (24).

Dado que existe una superposición en el contenido de los gránulos secundarios y terciarios, otros autores engloban a los gránulos en solo dos tipos principalmente, aquellos que son *peroxidasa positivos* o gránulos *azurófilos*, y los *peroxidasa negativos*. En los gránulos *peroxidasa negativos*, se ha demostrado que NGAL (lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos) es una proteína específica que colocaliza con lactoferrina y puede ser usada como marcadora específica de los mismos. Pueden dividirse a su vez en: a) gránulos que contienen lactoferrina y NGAL, b) gránulos que contienen lactoferrina, NGAL y gelatinasa y c) gránulos que contienen solo gelatinasa. Todos difieren en su densidad y en los tiempos para su degranulación (23).

Las llamadas *vesículas secretoras* contienen albúmina (24) entre otros componentes, siendo su principal marcador el CR1 (receptor del Complemento C3b C4b) (23). Estas vesículas fueron descubiertas como organelas de almacenamiento constituidas por proteínas de membrana que envuelven proteínas plasmáticas (25).

La presencia de otras organelas es escasa, pero se ha observado que los PMN neutrófilos poseen una compleja red de mitocondrias involucradas en la quimiotaxis y regulación de la apoptosis (4).



## Membrana plasmática de los PMN neutrófilos

La membrana plasmática del PMN neutrófilo posee variados receptores (26) (Tabla 1), entre los que se destacan:

- *Receptores Acoplados a Proteína G*: receptores para péptidos formilados, para leucotrieno B<sub>4</sub>, para factor activador de plaquetas, CXCL8, CXCL12 entre otros.
- *Receptores Fc*: FcγRIIA, FcγRIIIB, FcαRI, FcεR, entre otros
- *Moléculas de adhesión* tales como Selectinas/Ligandos para Selectinas e Integrinas: P-selectina, E-selectina, L-selectina, LFA-1 (α<sub>1</sub>β<sub>2</sub>; CD11a/CD18), Mac-1 (α<sub>M</sub>β<sub>2</sub>; CD11b/CD18)
- *Receptores de Citoquinas*: IL-4, IL-12, IL-15, IL-10, IFN α, IFN β, IFN γ, G-CSF, GM-CSF, IL-1, TNF, TGF β, IL-17, entre otros
- *Receptores de Quimioquinas*: CXCR1, CXCR2, CCR1, CCR2, entre otros
- *Receptores innatos de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (RRP)* como los receptores Tipo Toll o Lectinas Tipo C: con excepción de TLR3, expresa el resto de TLR; además MDL-1, Mcl, CLEC-2, NOD1, NOD2, entre otros.

Es de destacar el reconocimiento inmunitario innato por receptores tipo Toll frente a infecciones bacterianas, por ejemplo el importante TLR4 (más MD-2 y CD14) que tiene como ligandos al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias *Gram* negativas y a los ácidos lipoteicoicos de las bacterias *Gram* positivas.

La variedad de receptores de los PMN neutrófilos demuestra la versatilidad de interacciones posibles y refleja multiplicidad de roles en las respuestas inmunes (Tabla 1).

Tipo de receptor	Familia	Denominación
Receptores acoplados a proteína G	Receptores para péptidos formilados	FPR1, FPR2, FPR3
	Receptores quimiotractantes clásicos	BLT1 (Receptor Leucotrieno B4), BLT2, PAFR, C5aR
	Receptores de quimioquinas	CXCR1, CXCR2, CCR1, CCR2
Receptores Fc	Receptores Fc $\gamma$	Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA Fc $\gamma$ RIIB (inhibidor) Fc $\gamma$ RIIIB
	Receptores Fc $\alpha$	Fc $\alpha$ RI
	Receptores Fc $\epsilon$	Fc $\epsilon$ RI, Fc $\epsilon$ RII
Receptores de adhesión	Selectinas y Selectina ligandos	L-selectina, PSGL-1
	Integrinas	LFA-1, Mac-1, VLA-4
Receptores de citoquinas	Receptores de citoquinas tipo I	IL-4R, IL-6R, IL-12R, IL-15R G-CSFR, GM-CSFR
	Receptores de citoquinas tipo II	IFNAR (receptores para IFN $\alpha/\beta$ ), IFNGR, IL-10R
	Familia IL-1R	IL-1RI, IL-1RII, IL-18R
	Familia TNFR	TNFR1 (p55), TNFR2 (p75) Fas, LT $\beta$ R, RANK, TRAIL-R2 TRAIL-R3
Receptores inmunes innatos	Receptores tipo Toll	TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 TLR6, TLR8, TLR9
	Lectina tipo C	Dectina-1, Mincle MDL-1, Mcl, CLEC-2
	Receptores tipo NOD	NOD-2, NLRP3
	Receptores tipo RIG	RIG-I, MDA5

**Tabla 1. Variedad de receptores de PMN neutrófilos** según tipo, familia y denominación. Basado en Futosi *et al.*, 2013(26).

Se consideran aquí algunas moléculas marcadoras de neutrófilos tales como **CD66** (27). Dicha molécula se halla como CD66a o CD66b en gránulos específicos y de gelatinasa, también en pequeñas cantidades en las vesículas secretoras. Estas moléculas CD66 constituyen receptores de la galectina-3, que es una lectina de mamífero afín a los glicoconjugados. La galectina-3 en PMN neutrófilos induce la producción de aniones superóxidos (28). Es un receptor de membrana no tradicional de los PMN neutrófilos que permite reconocer hongos

patógenos por su unión a B 1-2 oligomanano. Por otro lado al ligarse a CD66a y CD66b, provoca agrupación de receptores, promoviendo adherencia y mejorando la capacidad fagocítica (29).

Es de destacar que los PMN neutrófilos expresan la molécula coestimuladora **CD40** en su membrana plasmática (30) y esta les permite interactuar con las células T y las células dendríticas plasmocitoides que portan CD40L. A través de la vía CD40-CD40L se induce una señalización en dos sentidos que transmite señales activadoras a las células T y también induce en la célula que porta el CD40 a la expresión de moléculas B7 (31).

Curiosamente, se ha observado que los PMN neutrófilos pueden expresar la molécula **CD4**, conocida como el co-receptor de células T colaboradoras, en forma superficial o citoplasmática, en pacientes sanos y en pacientes HIV positivos (32).

Por otra parte la molécula **CD45RO**, característico marcador de células T de memoria y efectoras, se expresa en PMN neutrófilos de pacientes con diálisis y PMN neutrófilos activados *in vitro* con fMLP (33). Esta molécula se expresa en individuos sanos pero no se ha hallado ligando natural (34). CD45RO se encontraría en los gránulos específicos de los PMN (33).

Es interesante la ausencia de trabajos publicados recientemente en relación a estos temas que abren preguntas de investigación.

### **Citoquinas de los PMN neutrófilos**

Las citoquinas son proteínas principales mediadoras de la comunicación entre las células del Sistema Inmune. Regulan y median las respuestas innatas, adaptativas y la hemopoiesis.

Los PMN neutrófilos secretan una amplia gama de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, entre otras), antiinflamatorias (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, IL-1ra), inmunoreguladoras (IL-12, IL-21, IL-23, entre otras), además de factores estimulantes de colonias, factores angiogénicos, fibrogénicos y miembros de la superfamilia del TNF, entre otras (35).

Las quimioquinas, citoquinas de baja masa molecular, que estimulan el movimiento de leucocitos junto a sus receptores contribuyen a la migración o la permanencia de las diferentes estirpes celulares inmunes (36). Los PMN neutrófilos representan la mayor fuente de producción de las mismas (CCL2, CCL17, CXCL12, CXCL9, entre otras), aún más en inflamación (infecciosa y no infecciosa) y tumores (37).

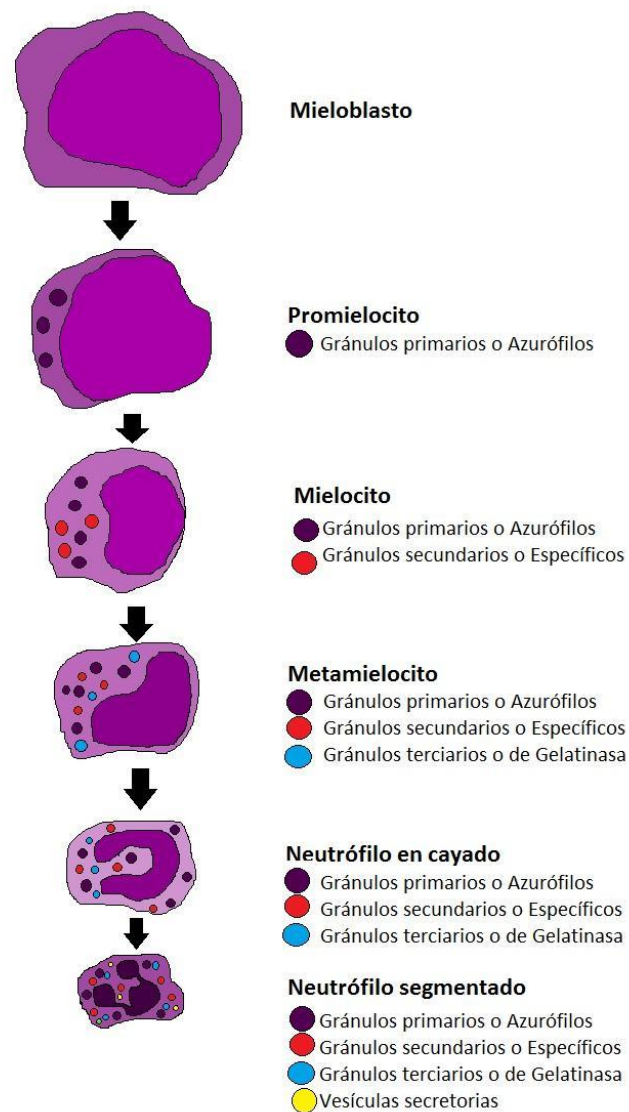
A través de la secreción de estas citoquinas y quimioquinas en la interacción con diversas células se considera que los PMN neutrófilos pueden influenciar las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

## Ontogenia de los PMN neutrófilos

Los PMN neutrófilos se originan en la médula ósea a partir de una célula madre pluripotencial, y antes de alcanzar su madurez, atraviesan diferentes estadios, a saber *mieloblasto*, *promielocito*, *mielocito*, *metamielocito*, *neutrófilo en cayado* y finalmente el *neutrófilo segmentado* (38,39) (Figura 2). La producción de PMN neutrófilos, es cuantitativamente la mayor actividad que se desarrolla en la médula ósea (40), alcanzando un número de  $1.10^{11}$ - $2.10^{11}$  de producción de PMN neutrófilos por día en los humanos (38), en respuesta al estímulo de varias citoquinas principalmente el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (39,41).

La liberación de los PMN neutrófilos al torrente sanguíneo, está regulada por la quimioquina CXCL2 que media la liberación de los mismos de la médula ósea al unirse a su receptor CXCR2, mientras que CXCL12 por otro lado promueve la retención de los PMN neutrófilos al unirse a CXCR4 (24). Se ha evidenciado que el número de PMN neutrófilos varía durante el día, dando lugar a oscilaciones que definen un ritmo circadiano (42).

Una vez que el PMN neutrófilo alcanza la circulación, puede formar parte del compartimiento o *pool* (*del Inglés*) marginal o bien del compartimiento circulante propiamente dicho. El *pool* marginal o "*pool fisiológico de granulocitos regionales*" comprende los PMN neutrófilos retenidos transitoriamente en la médula ósea y principalmente en los capilares pulmonares (43). Los PMN neutrófilos circulantes tienen una **vida media** de aproximadamente 6 a 12 horas (42), pero se ha observado que pueden vivir hasta 5,4 días (44). En un trabajo *in vitro* realizado en este laboratorio con PMN neutrófilos de sangre humana con serología positiva para Enfermedad de Chagas se observó PMN neutrófilos viables a las 72 horas de cultivo, postulándose esto debido a la presencia de citoquinas y mediadores inflamatorios en el suero de los dadores (45). Continuando con la descripción de la cinética de los PMN neutrófilos, finalmente estos alcanzan los tejidos, a través de quimioquinas y factores quimiotácticos donde cumplen sus funciones (46) y por lo general viven entre 24-48 horas hasta sufrir apoptosis (47).



**Figura 2. Ontogenia del PMN neutrófilo.** Dibujo esquemático que muestra distintos estadios: mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, neutrófilo en cayado, neutrófilo segmentado.

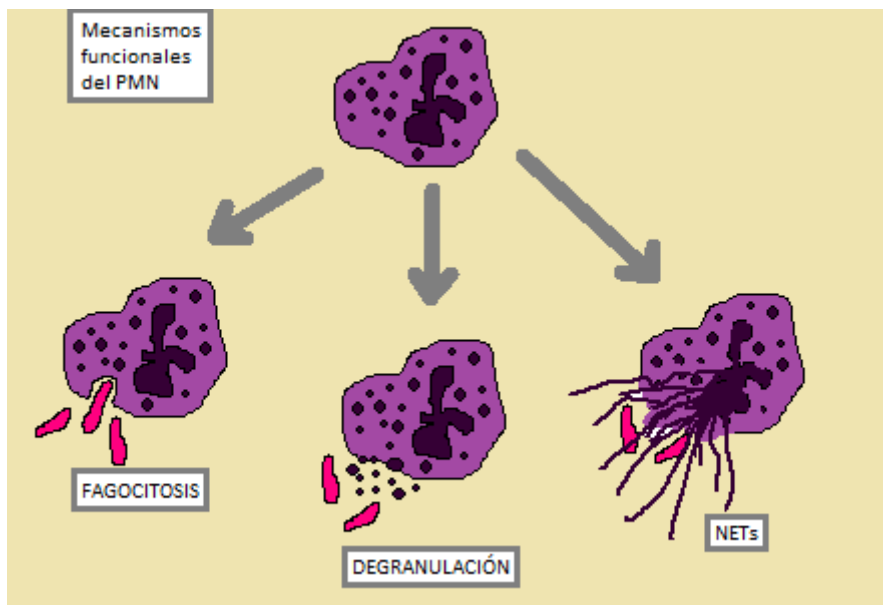
## Mecanismos funcionales de los PMN neutrófilos

### PMN neutrófilos en acción

Los PMN neutrófilos circulantes se encuentran en un “estado quiescente o de reposo” que se caracteriza por poca capacidad de adhesión, morfología redondeada, actividad transcripcional mínima y limitada respuesta frente a estímulos (48).

La transición del PMN neutrófilo de un estado de reposo a un estado de mayor capacidad de respuesta se ha denominado “*priming*” (*del Inglés*) o “cebado” (49). El “*priming*” sucede frente a la exposición del PMN neutrófilo a un primer estímulo, el cual puede desencadenarse por citoquinas y antígenos (50). Las consecuencias funcionales del *priming* derivan en cambios en la expresión de moléculas de adhesión, regulación en alta de receptores de superficie, producción y liberación de lípidos bioactivos, degranulación y liberación del contenido de los gránulos, polimerización de actina, incremento de fagocitosis, variación en la tasa de apoptosis de neutrófilos, entre otras (51). El cebado les permite a los PMN neutrófilos aumentar marcadamente su capacidad de respuesta frente a un nuevo estímulo que les otorgará la completa activación (52), permitiéndoles realizar sus funciones antibacterianas, pro y anti-inflamatorias (50).

Los PMN neutrófilos activados y reclutados a los sitios de inflamación, ejercen sus funciones a través de la fagocitosis, secreción de proteasas (degranulación), producción de *especies reactivas de oxígeno* (ROS) y liberación de NETs (53) (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismos funcionales de PMN neutrófilos.**Esquema de fagocitosis, degranulación y trampas extracelulares neutrófilas (NETs).

Los PMN neutrófilos pueden provocar la muerte intracelular de los patógenos a través de mecanismos mediados por enzimas proteolíticas o mediados por ROS generados a través del sistema de la NADPH.

## Fagocitosis

La ingestión de microorganismos o de partículas extrañas por los PMN neutrófilos se denomina “*fagocitosis*” (54). Dicha función se lleva a cabo directamente mediante el compromiso de RRP que reconocen PMAP, o bien mediante el recubrimiento de los microorganismos con inmunoglobulinas o proteínas del Complemento (C) que ayudan a promover la fagocitosis, lo que se denomina “*opsonización*” (54,55).

La fagocitosis es un proceso dependiente de energía y del citoesqueleto que provoca la formación de una vesícula intracelular llamada “*fagosoma*” la cual contiene el material ingerido.

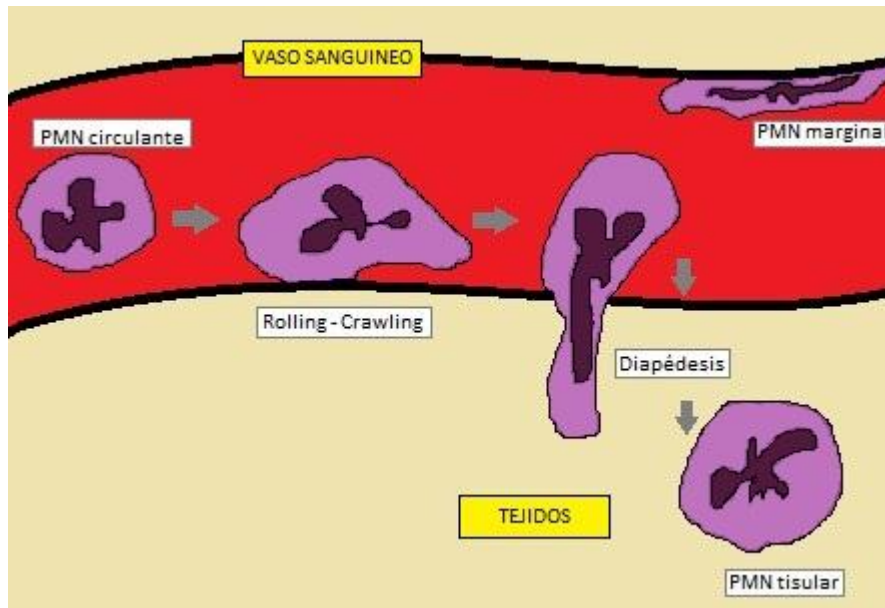
Antes de que la fagocitosis se inicie y sea efectiva, los PMN neutrófilos necesitan abandonar la circulación sanguínea y arribar al sitio de inflamación, proceso que se denomina “*reclutamiento de neutrófilos*” por quimiotaxis, movimiento regido por un gradiente de concentración químico (46). En el reclutamiento, los PMN neutrófilos despliegan una amplia gama de receptores de factores quimiotácticos tales como: receptores para IL-8, para péptidos formilados bacterianos (3,44), para el componente del C: C5a, para el PAF (factor activador de plaquetas), para el leucotrieno B4 (43) entre otros.

La migración leucocitaria desde la circulación hasta el sitio de inflamación está controlada por interacciones entre el PMN neutrófilo y el endotelio vascular. La proteína L-selectina expresada en la superficie neutrofilica se liga entonces a las proteínas E-selectina y P-selectina presentes en el endotelio (4). Se produce así, una adhesión transitoria que permite el rodamiento o “*rolling*” (*del Inglés*) del PMN neutrófilo en la superficie endotelial (3,43) (Figura 4).

A continuación se produce una firme adhesión del neutrófilo al endotelio, que se establece mediante la interacción de las  $\beta_2$  integrinas LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) y Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ) (CD11b/CD18) de la superficie del PMN neutrófilo con sus ligandos, ICAM-1 e ICAM-2, del endotelio (40). LFA-1 estaría implicada en la firme adhesión, mientras que Mac-1 le permitiría arrastrarse o “*crawling*” (*del Inglés*) (3) (Figura 4).

Posteriormente se produce la *diapédesis*, es decir la transmigración del PMN neutrófilo a través del endotelio (56), mediante dos vías: la “*vía transcelular*”, en la que el PMN neutrófilo penetra una célula endotelial y la “*vía paracelular*”, en la que el PMN neutrófilo se introduce entre dos células endoteliales (Figura 4).

Una vez atravesado el endotelio, el PMN neutrófilo cuenta con un arsenal de proteasas capaces de romper la membrana basal, tales como la EN y la gelatinasa, entre otras (40).



**Figura 4. Migración y extravasación de PMN neutrófilos.** Esquema de reclutamiento de PMN neutrófilos, se observa rodamiento (*rolling, del Inglés*), arrastre (*crawling, del Inglés*) y diapédesis.

Como se dijo anteriormente, la fagocitosis puede ser mediada directamente por RRP, entre los que se incluyen la familia de los receptores tipo Toll (TLR), los receptores lectina tipo C Dectina-1, CLEC-2, Mincle, como así también sensores citoplasmáticos como NOD-1, RIG1, MDA5 (57).

Por otro lado, se encuentran los receptores de opsonización tales como FcγRs, que permiten que se formen pseudópodos para englobar al patógeno y luego se internalicen formando el fagosoma (41). En cambio, los receptores del C que también median la opsonización, internalizan el microorganismo sin una extensión apreciable de la membrana, la partícula parece “hundirse” en la célula (55).

Luego de engullir el microorganismo, el fagosoma debe “madurar” para cumplir sus funciones. La maduración del fagosoma progresa a medida que los gránulos se le fusionan y se ensambla la NADPH oxidasa (Niconitamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa) a la membrana (55), con ello, las enzimas hidrolíticas y la NADPH oxidasa inician la destrucción del patógeno. El fagosoma maduro en los PMN neutrófilos a diferencia del que se observa en macrófagos, tiene pH neutro, lo que refleja los efectos del estallido oxidativo masivo en los PMN neutrófilos comparado con los macrófagos (41). Se ha observado que existe una heterogeneidad en el contenido de los fagosomas del PMN neutrófilo, resultado de la variabilidad del ensamblaje de la NADPH oxidasa y la fusión de los gránulos que contienen MPO



(58). Existen entonces dos mecanismos bioquímicos que participan en la destrucción de los microorganismos ingeridos, ambos participan en la muerte intracelular dependiente del oxígeno: el sistema NADPH de la membrana del fagosoma y el mecanismo de la MPO de los lisosomas. Esto se describirá más abajo en “*estallido respiratorio*”.

Los fagosomas así se fusionan con los lisosomas (gránulos primarios azurófilos) y otras estructuras vesiculares lo que lleva a la degradación enzimática del material ingerido. De este modo, pueden actuar otros mecanismos de muerte independiente del oxígeno a través de diversas enzimas y péptidos antimicrobianos.

Finalmente, el material digerido sufre exocitosis o se almacena en “cuerpos residuales”.

## **Degranulación**

Como se mencionó anteriormente, otro mecanismo funcional de los PMN neutrófilos consiste en la degranulación, esto es la liberación del contenido de los gránulos en el sitio donde los PMN neutrófilos ejercen sus funciones (31). También se denomina degranulación al proceso de fusión y liberación de gránulos en el fagolisosoma. Aquí sin embargo, se considerará al proceso de degranulación que ocurre en la exocitosis hacia el espacio extracelular.

Es importante aclarar que los diferentes gránulos neutrofílicos difieren en su contenido, en las señales requeridas para su secreción y el sitio de secreción (59).

La exocitosis o liberación del contenido de los gránulos está regulada por una señal binaria: a) la primera señal depende de la adhesión del PMN neutrófilo al endotelio, que involucra a proteínas como las integrinas; b) la segunda señal depende de la interacción entre un ligando y un receptor inmune (por ejemplo TLR1) (24).

Ante un estímulo se liberan primero las vesículas secretoras, sucesivamente lo hacen los gránulos ricos en ficolina-1, los gránulos que contienen gelatinasa, a posteriori los gránulos secundarios y finalmente los gránulos azurófilos (60).

Cuando se liberan las vesículas secretoras, éstas se fusionan con la membrana plasmática dotando a la misma con integrinas y otras proteínas de adhesión (59,61). El péptido bacteriano formilado formilmetionil-leucil-fenilalanina o f-Met-Leu-Phe (fMLP), un poderoso quimioattractante de PMN neutrófilos (62), induce la expresión de la integrina Mac-1 (CD11b/CD18) y la movilización de las vesículas secretoras (23).

El proceso de fusión de los gránulos con la membrana plasmática está mediado por la familia de proteínas de fusión SNARE (24,60).

A su vez, el citoesqueleto participa activamente en la movilización de los gránulos. Por una parte, los microtúbulos son importantes puesto que guían la degranulación de los gránulos primarios en el fagosoma. Por otro lado, la polimerización y despolimerización de los microfilamentos de actina afectan la degranulación de todos los gránulos, siendo las vesículas secretoras las más asociadas a la actina, seguidas por los gránulos de gelatinasa, gránulos específicos y gránulos azurófilos (23).

### **Estallido respiratorio**

Se denomina "*estallido respiratorio*" al proceso conducente a la generación de ROS utilizado como un mecanismo de destrucción de patógenos.

Como se dijo anteriormente uno de los mecanismos de muerte intracelular dependiente del oxígeno es el **sistema de la NADPH que genera ROS**. Cuando los PMN neutrófilos se encuentran frente a microorganismos o mediadores de la inflamación, la enzima NADPH oxidasa se ensambla a la membrana plasmática o a la membrana del fagosoma, produciendo ROS (63). La NADPH oxidasa posee varias isoformas (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 y Duox2) que pueden expresarse en varios compartimentos celulares como el núcleo, retículo endoplásmico, endosomas, fagosomas y mitocondrias. La isoforma NOX2, encontrada en los neutrófilos está formada por dos proteínas integrales de membrana, la glicoproteína gp91<sup>phox</sup> y la proteína adaptadora p22<sup>phox</sup>, que juntas conforman el flavocitocromo b558. En células no estimuladas, el multidominio regulador formado por las proteínas p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> se agrupan en el citosol. Diversos estímulos (físicos, químicos, biológicos) provocan la fosforilación de este complejo proteico, que migra a la membrana y se asocia al flavocitocromo b558 conformando la NADPH oxidasa activa (64). La NOX2 se activa cuando los PMN neutrófilos realizan fagocitosis, y las subunidades de la enzima se ensamblan antes de que el fagosoma termine de formarse. La mayoría de las subunidades gp91<sup>phox</sup> se encuentran en las membranas de los gránulos específicos, el resto en la membrana plasmática. La NOX2 también puede activarse con estímulos solubles sin necesidad de formación del fagosoma. El péptido bacteriano fMLP, induce la activación de NOX2 sólo en la membrana plasmática (54). Luego de la activación la NADPH oxidasa inicia la cascada de reducción de oxígeno, reduciendo el oxígeno molecular a anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Como el superóxido no es un fuerte oxidante, rápidamente

se dismuta formando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El superóxido puede también reaccionar con óxido nítrico para formar peroxinitrito, un poderoso antioxidante (55). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un oxidante muy estable que ejerce efectos tóxicos y actúa sobre distintos componentes microbianos.

Por otra parte, en el otro mecanismo bioquímico de la muerte intracelular dependiente del oxígeno, la MPO de los gránulos primarios de los PMN neutrófilos convierte el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ácido hipocloroso (HClO), que es el bactericida oxidante más eficiente en los PMN neutrófilos. Otros derivados del oxígeno como radicales hidroxilo, cloraminas y HClO pueden inactivar proteínas que contienen hierro y azufre, proteínas de membrana y sitios de síntesis de ADN (46).

Estas especies reactivas del oxígeno generadas por los PMN neutrófilos le dan la capacidad de destrucción de millones de bacterias en milisegundos (65).

Mutaciones en los genes que codifican los componentes de la NADPH oxidasa dan origen a la *enfermedad granulomatosa crónica* que se caracteriza por incapacidad de los PMN neutrófilos para producir ROS lo que lleva a infecciones bacterianas y micóticas recurrentes (65).

## **NETs**

Las “*trampas extracelulares neutrófilas*” o “*NETs*” fueron descritas por primera vez por Brinkmann et al en el año 2004, en PMN neutrófilos estimulados con IL-8, forbol miristato acetato (PMA) o lipopolisacárido (LPS) (66).

Las NETs están formadas por proteínas granulares y cromatina (67,68). También se postula que algunas NETs pueden contener ADN mitocondrial (69,70). Entre las proteínas granulares más importantes constituyentes de las NETs, se encuentran la MPO y la EN (71). Las histonas liberadas poseen actividad antibacteriana, al actuar directamente en la membrana del microorganismo quelando cationes, contribuyendo así a su destrucción (72).

La presencia de NETs puede ser evidenciada por la tinción extracelular de ADN y la colocalización de proteínas derivadas del PMN neutrófilo, como EN o MPO (73).

La liberación de NETs puede producir la muerte del neutrófilo (74), proceso que se ha denominado “*NETosis suicida*” (75); o bien el PMN neutrófilo puede vivir sin el contenido nuclear y aún seguir fagocitando o cumpliendo otras funciones (74), lo que se ha denominado “*NETosis vital*” (75).

Un gran número de inductores de NETosis han sido descritos (75–77), entre los que se pueden nombrar bacterias (78), componentes bacterianos (66), hongos (79), protozoarios (80), virus (81), plaquetas activadas (82), proteínas del C (83), inmunocomplejos (84,85), citoquinas (86), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (87), cristales de urato en la gota (88,89), cristales de pirofosfato de calcio en la pseudogota (90) y también ionóforos como el A23187 y la nigericina (91).

Los diferentes estímulos pueden comprometer diferentes vías de señalización (91), algunas de las cuales todavía se hallan bajo estudio (92). Por ejemplo el PMA (*phorbol myristate acetate, del Inglés*) puede inducir la formación de NETs mediante la vía Raf-MEK-ERK, al activar a la NADPH oxidasa (93).

La producción de NETs puede terminar produciendo efectos no deseados en el microambiente donde se encuentren, así se han visto implicadas en diversas enfermedades (94,95), distrés respiratorio agudo (96), trombosis (97), diabetes (98), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (99), aterosclerosis (100), apendicitis (66), preeclampsia (101), bronquiolitis (102,103), algunas enfermedades autoinmunitarias (104,105) como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Artritis Reumatoide (AR), Enfermedad de Sjögren, vasculitis; además de inmuoedición del cáncer (106). La inmuoedición se refiere al proceso mediante el cual la interacción de una población heterogénea de células tumorales con el sistema inmune, genera variantes tumorales con inmunogenicidad reducida que por lo tanto, podrían escapar de las respuestas inmunes (2).

En relación a la influencia de la edad de los humanos en la generación de NETs se ha observado que los PMN de los neonatos, comparados a los de los adultos, son menos capaces de formar NETs (107), lo mismo sucede con los PMN en los adultos mayores (108). Llamativamente, el ejercicio intenso puede inducir la liberación de NETs (109). Por otra parte, en muestras de sangre sin estimular, se ha observado que el 3 al 5 % de neutrófilos genera NETs de manera espontánea (110), como así también se ha documentado que en cultivos autólogos de PMN purificados, libres de suero del donante, se favorece la liberación de NETs (111).

### **Mecanismo de formación de NETs**

En la *NETosis suicida* primero el núcleo del PMN neutrófilo pierde su estructura lobulada y la distinción entre hetero y eucromatina, luego desaparece la membrana interna nuclear permitiendo la mezcla de los componentes, emergiendo todo el contenido al romperse la membrana plasmática en un proceso distinto de la necrosis o apoptosis (Figura 5). En la

necrosis, aunque también sucede que el núcleo pierde su estructura, sus lóbulos se fusionan en una masa homogénea y se pierde la segregación entre eu y heterocromatina, la membrana nuclear y los gránulos permanecen intactos a diferencia de la NETosis. Por otro lado en la apoptosis se produce condensación y fragmentación nuclear, como así también vacuolización del citoplasma. La NETosis es dependiente de la generación de ROS por la NADPH oxidasa (68). La producción de ROS permite la liberación de la EN y la MPO de los gránulos azurófilos (71), de un complejo denominado “*azurosoma*” formado además por lactoferrina, azurocidina y PR3. La EN se une al citoesqueleto de actina, promoviendo su degradación y liberando las proteasas para translocarse al núcleo (112). En el núcleo la EN digiere las histonas nucleosomales y promueve la decondensación de la cromatina, la MPO sinergiza esta acción (71). Hay autores que demuestran que la presencia de MPO puede ser necesaria (113) o no para la formación de NETs (114). También se ha evidenciado que además de la presencia de ROS, se requiere autofagia para la producción de las NETs en PMN neutrófilos estimulados con PMA debido a que éste último induce la formación y maduración de autofagosomas (115).

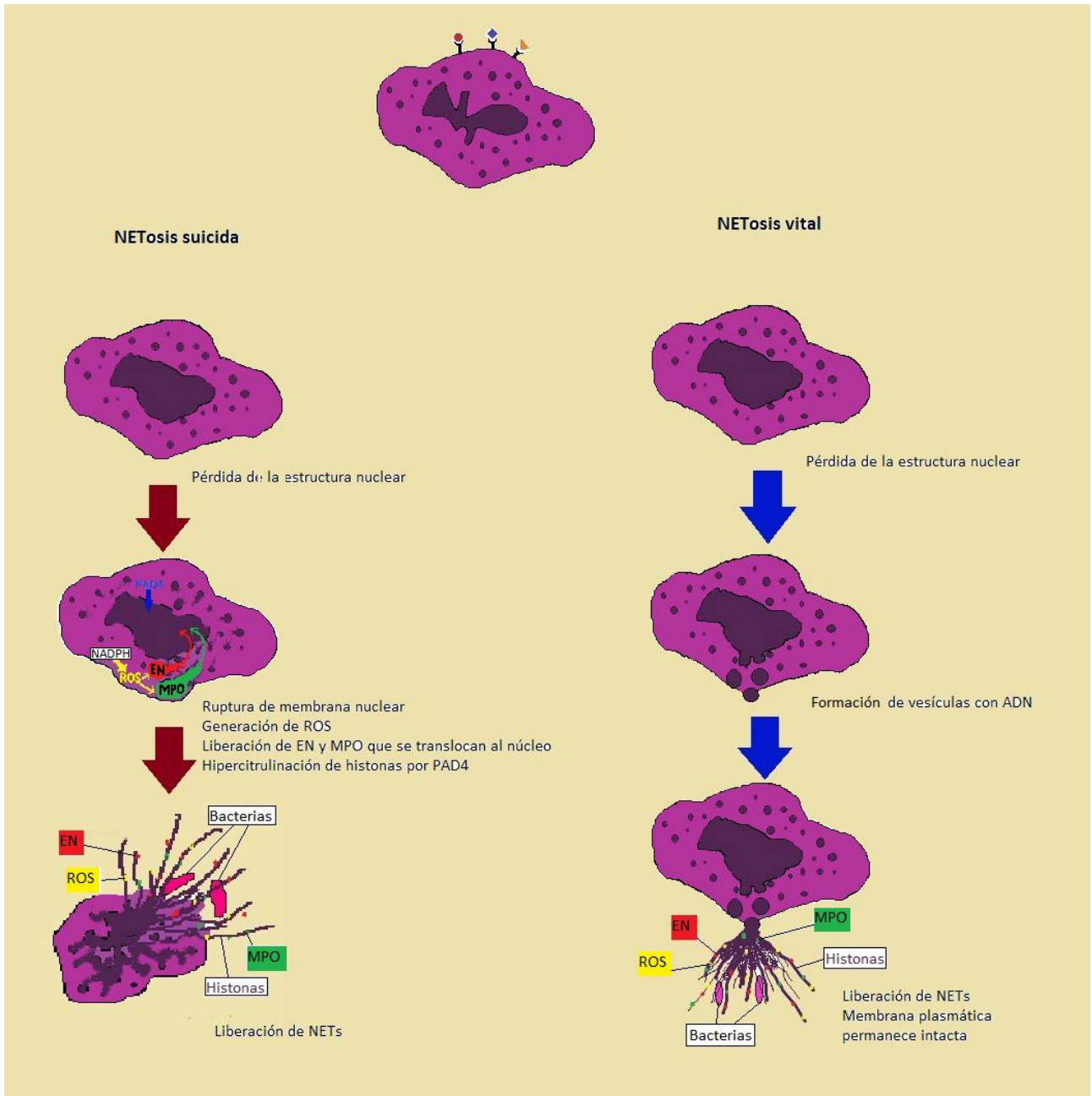
Por otro lado, la enzima peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4) mediaría la hipercitrulinación de las histonas lo que contribuye también a la descondensación de la cromatina (116).

Los microfilamentos de actina y los microtúbulos también son requeridos para el despliegue de las NETs (117). Se sabe también que la dinámica de estos componentes del citoesqueleto, es en parte regulada por los ROS (118).

Los requerimientos energéticos para la liberación de las trampas están principalmente mediados por glucosa y en menor parte por glutamina (119).

La *NETosis vital* tiene la característica de que la membrana plasmática del PMN neutrófilo permanece intacta, mientras que la cromatina del núcleo se libera a través de vesículas que luego se fusionan con la membrana externa para liberar NETs al espacio extracelular (120) (Figura 5).

La naturaleza de la formación de las NETs puede diferir en tiempo, tipo de estímulo o el contexto de una enfermedad (121).



**Figura 5. Dibujo esquemático de NETosis suicida y NETosis vital.** Basado en Branzk y Papayannopoulos, 2013.

## **Interacciones relevantes**

### **PMN neutrófilos y plaquetas**

Las plaquetas aumentan las funciones efectoras de los PMN neutrófilos promoviendo la fagocitosis, la liberación de ROS y NETosis.

Por otra parte, las plaquetas facilitan el rodamiento, adhesión y transmigración de los PMN neutrófilos a través de los vasos sanguíneos. En el “*rolling*” y adhesión intervienen CD62P y la CXCR2 que se expresan en las plaquetas. En la trans migración PSGL-1 o Mac-1 del neutrófilo se unen al CD62P, y también CD40 del PMN al CD40L soluble derivado de plaquetas lo que resulta en polarización de los receptores, que es un prerrequisito para la trans migración (122).

Las plaquetas también facilitan la liberación de quimioquinas por parte de los neutrófilos.

En la formación de NETs, las plaquetas activadas mediante el TLR4 se unen a los neutrófilos que se adhieren al endotelio e inician la formación de NETs. También median la NETosis via CD62P-PSGL-1, GPIb alfa plaquetario o LFA-1. También las plaquetas liberan beta defensinas, tromboxano A2, CXCL4, vWF y HMGB1 que promueven la formación de NETs (122).

### **PMN neutrófilos y macrófagos**

Los PMN neutrófilos contribuyen a la activación y reclutamiento de los macrófagos en el sitio de infección o en la inflamación aguda (123). Hay evidencias de la existencia de subconjuntos de PMN neutrófilos que muestran un patrón único de producción de citoquinas y quimioquinas y difieren en la expresión de receptores TLR y de integrinas. Es posible que estas formas de PMN neutrófilos “*proinflamatorios*” y “*antiinflamatorios*” cambien el curso de la respuesta inmune induciendo macrófagos M1 o *clásicamente activados* y macrófagos M2 *activados en perfil alternativo*, respectivamente (44). Es de destacar el rol que tienen los macrófagos en la resolución de la inflamación por la fagocitosis de PMN neutrófilos apoptóticos y a través de citoquinas tales como la IL-10 la promoción de la reparación tisular (124,125).

Las interacciones de PMN neutrófilos y de macrófagos pueden ser protumorales, potenciando la invasión de células tumorales y la metástasis, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular (126).

## PMN neutrófilos y células T

Los PMN neutrófilos liberan quimioquinas que atraen a los linfocitos T a los sitios de inflamación (127–129) y también citoquinas que influyen en la diferenciación y proliferación, en algunos casos incrementándola y en otros suprimiéndola (130,131).

Por otra parte, se ha observado que las NETs liberadas por los neutrófilos producirían sensibilización de células T reduciendo su umbral de activación. La sensibilización mediada por NETs incrementa la respuesta de la célula T a un antígeno específico aun si el estímulo es sub-óptimo y requiere contacto entre la célula T y las NETs y señalización a través del TCR (130).

Las células Th 17 representan un perfil de diferenciación de células T CD4 que cumple un papel destacado en la inmunidad frente a bacterias extracelulares e infecciones micóticas y también han sido relacionadas a fenómenos de autoinmunidad. Las citoquinas IL17A, IL17F secretadas por Th 17 inducen una rápida y masiva infiltración del tejido afectado por los neutrófilos (65). PMN neutrófilos apoptóticos son fagocitados por macrófagos quienes disminuyen la producción de IL-23, por lo tanto las células Th17 generan menos IL-17 y los fibroblastos y células endoteliales producen menos G-CSF, disminuyendo la producción de PMN en médula ósea (40). Neutrófilos y células Th17 se han visto co-localizadas en tejidos del intestino de pacientes con enfermedad de Crohn y en líquido sinovial de pacientes con AR, en tejidos aislados de pacientes con asma y en tejidos con infección con *Helicobacter pylori* (123). Experimentalmente se observó que PMN neutrófilos humanos estimulados *in vitro* con IFN gamma y LPS exhibieron un significativo efecto quimiotáctico sobre células Th1 y Th17 (123,129). En experimentos con ratones neutropénicos se ha descrito que los PMN neutrófilos regulan las respuestas de células T CD4 y de células B (132).

La participación de los PMN neutrófilos en la respuesta inmune adaptativa no ha sido considerado relevante hasta hace poco, cuando se ha reconocido incipientemente que los PMN y células T pueden participar en múltiples interacciones incluida la activación mutua (128).

En experimentos con muestras de sangre de pacientes con serología positiva para Chagas se han observado interacciones de contacto entre PMN neutrófilos y linfocitos. Observaciones ultraestructurales con MET permitieron ver en linfocitos la distribución de mitocondrias en el citoplasma colindante a la zona de contacto con PMN neutrófilos, en la vecindad a la superficie celular. Las membranas plasmáticas de las células en interacción se observaron en cerrado contacto (133).

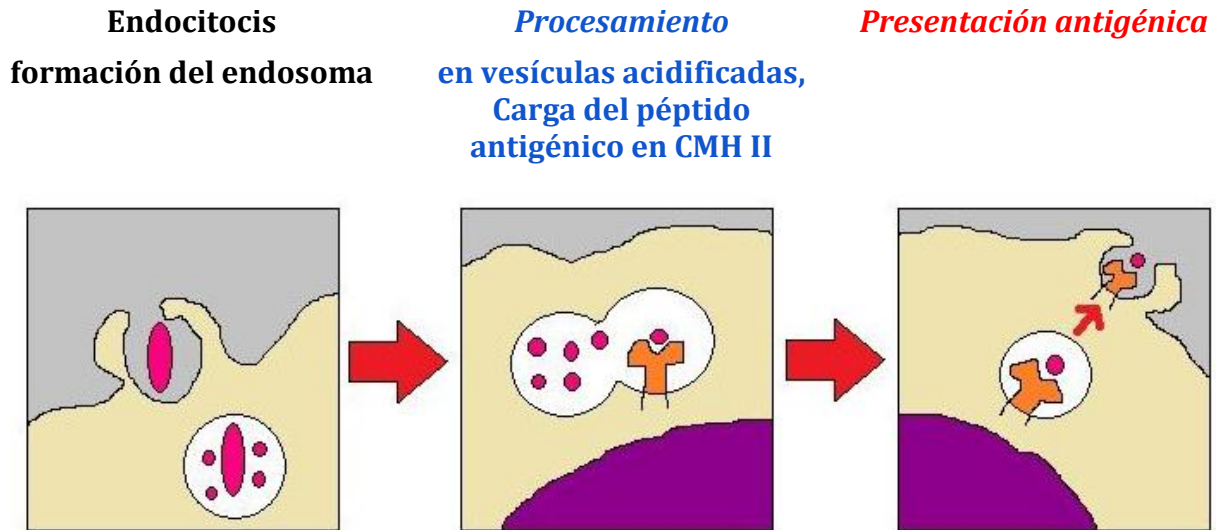


## Procesamiento y presentación de antígenos

El procesamiento y presentación de antígenos se requiere para la activación de células T, pero no para las células B, ya que estas últimas reconocen el antígeno en su conformación nativa. El procesamiento y la presentación de antígenos ocurren en las CPAs. Involucra la acción de proteasas que cortan a la proteína antigénica en pequeños péptidos. Luego, es necesario que esos péptidos se asocien con moléculas Clase I o Clase II del CMH. Finalmente, se requiere que los complejos péptido antigénico/molécula CMH se expresen en la superficie celular. Los requisitos de las CPAs son los siguientes: expresar moléculas del CMH Clase I (como la mayoría de las células nucleadas del organismo) o Clase II (como los macrófagos, la mayoría de las células dendríticas y las células B) y contener proteasas capaces de degradar proteínas y generar péptidos adecuados para su presentación por las moléculas del CMH (31).

Existen diferentes vías de procesamiento y presentación de antígenos: *Vía Clase I del CMH (endógena o biosintética)*, *Vía Clase II del CMH (exógena o endocítica)*, *Vías Cruzadas* y la *Vía del CD1*. En la *Vía Clase I (endógena o biosintética)*: los péptidos presentados son derivados de proteínas presentes en el citosol, presentados por moléculas Clase I a linfocitos T CD8+. En la *Vía Clase II (exógena o endocítica)*: los péptidos derivados de proteínas presentes en compartimiento endosómico, son presentados por moléculas Clase II a linfocitos T CD4+. En las *Vías Cruzadas*: la presentación de péptidos del citosol se realiza a través de moléculas Clase II y la presentación de péptidos del compartimiento endosómico ocurre a través de moléculas Clase I. En la *Vía del CD1*: se realiza la presentación de glucolípidos y péptidos hidrófobos, a linfocitos T con receptor TCR $\alpha\beta$  y con TCR $\gamma\delta$ , y a células NKT (31).

En este trabajo de Tesis es de interés la *Vía Clase II* de procesamiento y presentación antigénica (Figura 6) en relación a las células en estudio teniendo en cuenta la hipótesis y los objetivos que se describirán más adelante.



**Figura 6. Vía Clase II de procesamiento y presentación de antígenos.** Esquema simplificado basado en Murphy y Weaver, 2017. El antígeno es endocitado desde el espacio extracelular. En endosomas tempranos el pH es neutro. La acidificación de las vesículas endosómicas activa las proteasas para el procesamiento del antígeno a fragmentos peptídicos. Las vesículas que contienen péptidos antigénicos se fusionan con vesículas portadoras de moléculas del CMH clase II.

### Sinapsis inmunológica

En la actualidad, se postula que el área de contacto entre una CPA y la célula T se denomina “Sinapsis inmunológica” (SI) (134–137) (Figura 7). Se ha descrito la segregación espacial de proteínas en el sitio de contacto en a) el complejo de activación supramolecular central o *c-SMAC* (*Central-Supramolecular Activation Complex, del Inglés*) con las moléculas: receptor TCR, co-receptor CD4 (o CD8) y receptor de coestimulación CD28, entre otras, en la célula T y sus ligandos en la CPA: péptido-CMH clase II (o I) y moléculas coestimuladoras B7 ; y b) el complejo de activación supramolecular periférico o *p-SMAC* (*Peripheral-Supramolecular Activation Complex, del Inglés*) con las moléculas de adhesión LFA-1, entre otras, en la célula T y sus ligandos ICAM-1 en la CPA (138). Se ha agregado recientemente un *d-SMAC* (*Distal-Supramolecular Activation Complex, del Inglés*) en el esquema de la SI, que contiene a un denso anillo de filamentos de actina (139).

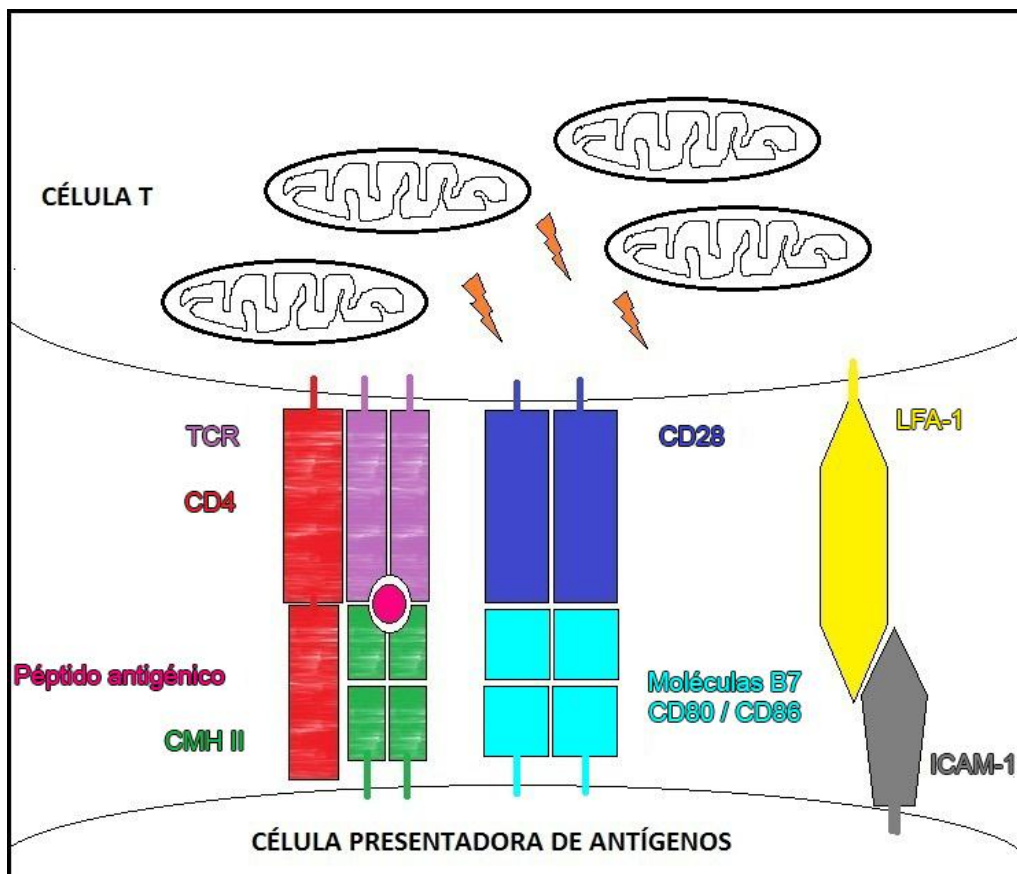
La SI fue descrita, primeramente, como el contacto intercelular entre linfocitos T y CPAs, para la secreción dirigida de citoquinas, con agrupamiento de proteínas en el área de contacto. Esto se relacionó al proceso de activación celular (140). Posteriormente, observaciones entre células blanco y células NK, o células B, requirió extender el concepto a otros efectores

inmunológicos. Sin embargo, en las SIs pueden prevenirse funciones efectoras, y ser SIs inhibitorias (141).

La SI, contacto íntimo entre una célula T y una célula presentadora de antígeno es una estructura especializada que cumple varias funciones, un puente de comunicación que activa diferentes vías de señalización, lo que resulta en la polarización de citoquinas, tubulina, actina y mitocondrias en las células T (142).

La posición de las mitocondrias controla el influjo de Calcio hacia la SI en las células T (143,144). La activación de células T requiere translocación mitocondrial hacia la SI (145).

Investigadores del laboratorio donde se realizó esta Tesis describieron un modelo de formación de SI, que implica procesamiento y presentación de antígenos al que se denominó *roseta macrófago linfocitaria (RML)* en cultivos autólogos de leucocitos totales humanos (146–148). En las RMLs se observó redistribución de mitocondrias en linfocitos hacia la superficie de SIs.



**Figura 7. Sinapsis inmunológica.** Esquema simplificado. Se observa en la célula T: el receptor TCR, el co-receptor CD4, el receptor de coestimulación CD28 y la molécula de adhesión LFA-1. Además en el citoplasma se ubican mitocondrias en la vecindad. En la célula presentadora de antígenos se observa la molécula CMH II presentando el péptido antigénico, además las moléculas coestimuladoras B7 (CD80/CD86) y la molécula de adhesión ICAM-1.

Se han descrito a las microvellosidades de las células T como “*sinaptosomas inmunológicos*” que llevan mensajes a las CPAs (149). Se reportó que las células T depositan partículas de membrana derivadas de las microvellosidades en las zonas de superficie de contacto de las CPAs. Las microvellosidades transportan TCR en todas las etapas de activación de las células T y se liberan como grandes partículas de microvellosidades enriquecidas con TCR en un proceso de *trogocitosis (del Griego)* que implica la transferencia de proteínas entre células inmunes (150).

### **Activación de células T y moléculas co-estimuladoras**

Las moléculas B7 son glicoproteínas integrales de membrana expresadas en las CPAs. En monocitos, macrófagos y células dendríticas sin estimulación, la expresión de la molécula B7-1: CD80 es ausente o baja. La molécula B7-2: CD86 en las mismas células se expresa de forma constitutiva (151). Estas moléculas B7 (CD80 y CD86) se producen en las CPAs en respuesta a la señalización por estimulación con PAMP tales como por ej. LPS a través del compromiso de TLR4 (31). Sustancias tales como el LPS que inducen actividad coestimuladora se usan desde hace años como “*adyuvantes*” para inducir inmunogenicidad en antígenos proteicos administrándolos en conjunto en vacunas (31).

La **activación de la célula T** se inicia con una *primera señal*, la interacción entre el péptido antigénico y el CMH con el TCR y una *segunda señal*, la “señal coestimuladora”. Actualmente se considera una *tercera señal*, la dada por las citoquinas del contexto (31).

La ausencia de coestimulación en células T vírgenes resulta en “*anergia*” que es un estado de falta de respuesta a un estímulo antigénico. Este es uno de los mecanismos que funciona en la tolerancia periférica para evitar las respuestas inmunes a antígenos propios en los tejidos periféricos, ya que las moléculas coestimuladoras sólo se expresan en CPAs profesionales (31).

La segunda señal puede ser estimuladora o inhibidora, esto depende del receptor. La vía B7-1 CD80/B7-2 CD86:CD28/CTLA-4 (CD152) es la vía mejor caracterizada de coestimulación de células T. La interacción de CD28 con moléculas B7 es necesaria para la expansión clonal óptima de las células T vírgenes. La coestimulación CD28-dependiente de las células T activadas induce la expresión de IL-2 y la del receptor de IL-2 de alta afinidad (152). CD28 se expresa constitutivamente en células T vírgenes, en contraste, la expresión de CTLA-4 (CD152) cuya función es proporcionar señales inhibitorias a los linfocitos T se induce luego de la activación

de la célula T. Esto es esencial para limitar la respuesta proliferativa de las células T activadas (153). Las células T activadas como así también las células T reguladoras (Treg) juegan un rol importante en el mantenimiento de la autotolerancia periférica, expresando CTLA-4. El receptor inhibitorio CTLA-4 (CD152) tiene mayor afinidad para ligarse a las moléculas B7 (CD80 y CD86) comparado con CD28. La transendocitosis de moléculas B7: CD80 y CD86 por CTLA-4 ha sido descripta. CTLA-4 captura ligandos (moléculas B7: CD80 y CD86) de las CPAs y los degrada en el interior de las células que expresan CTLA-4. Este proceso remueve las moléculas B7 de las células vecinas lo que resulta en disminución de la coestimulación via CD28 (154).

Cabe destacar la importancia médica de estas vías de señalización celular en los linfocitos, ya que los receptores inhibidores regulan las respuestas inmunes. Recientemente se ha otorgado el Premio Nobel de Medicina 2018 (155) a los investigadores James Allison y Tasuku Honjo por sus descubrimientos de la terapia contra el cáncer por inhibición de la regulación inmune negativa. Allison estudió CTLA-4 (156) y Honjo estudió PD-1 (157), ambas proteínas involucradas en la inhibición de las células inmunes.

Evidencias recientes demuestran que las células de memoria también requieren coestimulación para una máxima expansión clonal y eficiente eliminación de un patógeno (158).

Por otra parte, se ha probado la existencia de moléculas CD80 (sCD80), CD86 (sCD86) y CTLA-4 (sCTLA-4) solubles, que cumplirían las mismas funciones que sus pares de membrana. (159–162).

### **Antecedentes sobre PMN neutrófilos como CPA**

Sandilands *et al.*, observaron que el compromiso del receptor de membrana CD11b de los PMN neutrófilos resulta en la rápida expresión en superficie de moléculas requeridas para la presentación de antígenos y la activación de células T. También describieron que la molécula coestimuladora B7-1 CD80 se encuentra preformada en las vesículas secretoras junto con HLA-DR (CMH II) y la molécula coestimuladora B7-2 CD86 en vesículas secretoras, gránulos secundarios y azurófilos (163,164).

Varias citoquinas proinflamatorias producidas en sitios de inflamación activan a PMN neutrófilos, suprimen su apoptosis y estos PMN neutrófilos activados por citoquinas muestran expresión de moléculas que los hacen competentes para la presentación antigénica (165).

En ciertas enfermedades, los PMN neutrófilos adquieren características de CPA, por ejemplo en pacientes con granulomatosis de Wegener (166). También se ha descrito que PMN neutrófilos aislados del fluido sinovial de pacientes con AR expresan moléculas Clase II del CMH (167).

En modelos murinos se describió experimentalmente la diferenciación de PMN neutrófilos hacia una población celular híbrida que exhibe un fenotipo dual con función de PMN neutrófilos y células dendríticas (168). También se reportó la presentación de antígenos restringidos a Clase II (169,170). En otras situaciones experimentales, PMN neutrófilos murinos pueden comportarse como CPA capaces de provocar la diferenciación de linfocitos en células efectoras Th1 y Th17 (171).

Trabajos recientes describen algunos PMN neutrófilos en sitios de inflamación que expresan fenotipo de CPA —se consideran a las moléculas B7 (B7-1, CD80 y B7-2, CD86) y a CMH clase II (HLA-DR) como marcadoras del *fenotipo CPA de PMN neutrófilo* (172).

## HIPÓTESIS

Los PMN neutrófilos presentan diferencias fenotípicas según el estímulo y condiciones diversas de activación *in vitro*.

Los PMN neutrófilos que presentan características fenotípicas como CPA expresando las moléculas B7 (CD80, CD86) y CMH clase II (HLA-DR), son capaces de expresar estas moléculas en las NETs.

## OBJETIVOS GENERALES

Desarrollar *in vitro* fenotipos de PMN neutrófilos según diversos estímulos y condiciones de activación.

Desarrollar *in vitro* el fenotipo CPA de PMN neutrófilos y estudiar la expresión y características biológicas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Generar *in vitro* fenotipos de PMN neutrófilos con estimulación clásica (LPS, fMLP) y no clásica (OVA) y: a) estudiar la expresión de moléculas de superficie en los fenotipos generados (CD80, CD86 y HLA-DR) en cultivos de leucocitos totales autólogos y en PMN neutrófilos purificados. b) estudiar la expresión de moléculas de superficie CD4 y CD45-RO en PMN neutrófilos purificados.
- 2) Determinar el tiempo de vida *in vitro* de los fenotipos generados.
- 3) Provocar la generación de NETs en PMN neutrófilos purificados y en cultivos de leucocitos totales autólogos con estimuladores clásicos (LPS, fMLP) y con uno no clásico (OVA) y estudiar la expresión de moléculas relacionadas al fenotipo de CPA del PMN neutrófilo y de moléculas CD4 y CD45-RO en las NETs.
- 4) Estudiar la ocurrencia de Sinapsis Inmunológicas (modelo RML con y sin antígeno heterólogo: OVA y con y sin inhibidor de procesamiento y presentación antigénica vía Clase II: cloroquina) en presencia de PMN neutrófilos con fenotipo CPA.
- 5) Estudiar la ocurrencia de interacciones celulares de contacto entre linfocitos y PMN neutrófilos con MO y MET.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras**

Se utilizaron muestras de sangre humana anticoagulada con heparina, obtenidas con consentimiento informado de personas sanas (n=50) donadas por el Banco de Sangre del Instituto de Hematología y Hemoterapia (IHH) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), en anonimato, con datos de serología. Aprobación por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas, FCM, UNC, registro 169/13.

Las muestras de sangre son sometidas a las siguientes pruebas en el IHH, UNC: Hudleson (Wiener), VDRL (Wiener), Chagas HAI (Wiener), Chagas EIE (Biomerieux), HBs EIE (Biomerieux), HBc (Biomerieux), HCV EIE (Murex), HIV Ac EIE (Biomerieux), HIV Ag EIE (Biomerieux), HTLV EIE (Murex).

### **Obtención de leucocitos totales autólogos**

Las muestras de sangre se dejaron sedimentar durante 2 horas. El sobrenadante del plasma con leucocitos totales se separó mediante pipetas Pasteur en condiciones de esterilidad bajo campana equipada con luz ultravioleta, flujo laminar y se usó para realizar los cultivos.

### **Cultivos autólogos de leucocitos totales**

Las muestras obtenidas mediante pipetas Pasteur se cultivaron a 37° C en medio TC199 (Sigma, St- Louis, MO) suplementado con L -glutamina (Sigma, St. Louis, MO), añadiendo suero filtrado del mismo donante. La densidad final de siembra se ajustó a 300.000 células/ ml. Se realizó test clásico de viabilidad celular por exclusión Azul Tripán al 0,5 %. Todos los cultivos celulares se prepararon en condiciones de esterilidad bajo campana equipada con luz ultravioleta y flujo laminar. El cultivo se realizó en una placa de 24 pocillos, poniendo una hoja de cubierta de vidrio de 13 mm estéril en cada pocillo.

## **Purificación de PMN neutrófilos (Böyum, 1968; English, Andersen, 1974). Gradiente Histopaque ® 1119 (Sigma). (173,174)**

Se colocó en tubo cónico Histopaque ® 1119 (SIGMA Chem.co.) y luego Histopaque ® 1077 (SIGMA Chem.co.) en igual volumen, la muestra de sangre venosa anticoagulada con heparina, se depositó cuidadosamente sobre ésta solución de polisacarosa y ditrizoato de Sodio, formándose un doble gradiente que permitió separar según su velocidad de sedimentación por centrifugación a 700g, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Los granulocitos se encontraron en la interfase 1077/1119 y las células mononucleares (linfocitos y monocitos) las plaquetas permanecieron en la interfase plasma - Histopaque ® 1077, mientras los eritrocitos se agruparon según su velocidad de sedimentación en el fondo del tubo. Las mezclas Histopaque ® 1077 y 1119 se almacenaron en heladera (2-8°C), y protegidas de la luz.

### **Procedimiento:**

- 1) Se colocaron 3 ml de Histopaque® 1119 en un tubo de centrífuga cónico (estéril), a temperatura ambiente.
- 2) Se colocaron 3 ml de Histopaque® 1077 sobre lo anterior.
- 3) Se depositaron cuidadosamente 3 ml de sangre sobre el Histopaque® 1077. Se centrifugó a 700 g, a temperatura ambiente, durante 30 minutos.
- 4) Se observaron dos capas opacas (A) y (B)
- 5) Luego de la centrifugación, se aspiraron cuidadosamente con pipeta Pasteur la capa interfase superior opaca (A) y se transfirió cuidadosamente esta capa conteniendo los leucocitos mononucleares (MN) a un tubo rotulado como "MN".
- 6) Se aspiró y descartó el fluido hasta 0,5 cm de la interfase B que contiene los granulocitos. Se transfirió cuidadosamente la interfase opaca B (que contiene los leucocitos PMN) con pipeta Pasteur a un tubo cónico estéril rotulado "PMN".
- 7) Se agregó 10 ml de PBS (Solución Salina de Buffer Fosfato; BioGenex, San Ramón, CA) estéril y se mezcló por aspiración suave con pipeta Pasteur. Se centrifugó a 200 g, 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se descartó.
- 8) Las células sedimentadas se resuspendieron con 5 ml de PBS. Se mezcló por aspiración suave con pipeta Pasteur.
- 9) Se repitieron los pasos 7) y 8) por dos veces.
- 10) Se resuspendieron las células sedimentadas con 0,5 ml de PBS.

### **Cultivos autólogos de PMN neutrófilos purificados.**

Muestras obtenidas por el Método de Böyum y English, Andersen (Böyum, 1968; English, Andersen, 1974) ya descrito anteriormente, se utilizaron para realizar cultivos de neutrófilos purificados a 37° C en medio TC199 (Sigma, St- Louis, MO) suplementado con L -glutamina (Sigma, St. Louis, MO), añadiendo suero filtrado del mismo donante. Se realizó test clásico de viabilidad celular por exclusión Azul Tripán al 0,5 %. Todos los cultivos celulares se prepararon en condiciones de esterilidad bajo campana equipada con luz ultravioleta y flujo laminar. El cultivo se realizó en una placa de 24 pocillos, poniendo una hoja de cubierta de vidrio de 13 mm estéril en cada pocillo.

### **Co-cultivo de PMN neutrófilos purificados estimulados y leucocitos MN purificados**

Luego de la purificación de PMN neutrófilos y leucocitos MN según el protocolo ya descrito (Gradiente Histopaque ® Sigma 1119 y 1077) por una parte se realizó el cultivo de los PMN neutrófilos purificados en pocillos de una placa de cultivo. Por otro lado, los MN se colocaron en pocillos de otra placa de cultivo.

Se realizó estimulación con LPS durante 30 minutos a PMN neutrófilos purificados según técnica de estimulación (ver más abajo). Pasado dicho tiempo, se tomó la muestra del pocillo mediante pipeta Pasteur transfiriéndola cuidadosamente a un tubo cónico. Se lavó el pocillo con PBS a 37° C para obtener el mayor número de PMN neutrófilos estimulados y se transfirió al tubo cónico. Se sometió a centrifugación a 200g el tubo cónico con los PMN neutrófilos durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con PBS nuevamente. Se agitó suavemente esta citopreparación que contenía los PMN neutrófilos y se transfirió a un pocillo de la placa que contenía los leucocitos MN en medio de cultivo.

El co-cultivo de los PMN neutrófilos purificados y estimulados con LPS, con leucocitos MN purificados, se dejó en estufa de cultivo a 37° C durante diferentes tiempos según la situación experimental.

## **Muestras apareadas sin estimulación, controles**

“Fenotipo PMN neutrófilo control”: muestras apareadas sin estimulación

### **Estimulación de PMN neutrófilos**

La estimulación de neutrófilos se realizó mediante el agregado de diferentes estimuladores, a los pocillos de las placas de cultivo conteniendo leucocitos totales o PMN neutrófilos purificados con medio de cultivo a tiempo cero. En todos los casos hubo muestras de cultivos controles sin añadido de estimuladores.

Lipopolisacárido LPS (Sigma Aldrich). Se agregó LPS en una concentración de 25 ng/ml. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, según la situación experimental.

Péptidos formilados fMLP (fenyl-Met-Leu-Phe) (Sigma Aldrich). Se agregó fMLP en una concentración de 0,25 ng/ml. Se tomaron muestras a los 30 minutos.

Ovoalbúmina (OVA). Se usó una concentración final 100 µg/ml. Se tomaron muestras a partir de cultivos a diferentes tiempos según la situación experimental.

### **Desarrollo *in vitro* del fenotipo PMN neutrófilo CPA**

Se consideraron a las moléculas B7 (B7-1, CD80 y B7-2, CD86) y a CMH clase II (HLA-DR) como marcadoras del fenotipo CPA de PMN neutrófilos. Para el desarrollo del fenotipo PMN CPA se usaron los estimuladores de neutrófilos ya citados (LPS, fMLP, OVA). Se tomaron muestras de cultivos de leucocitos autólogos totales y PMN neutrófilos purificados, a diferentes tiempos según la situación experimental, para observación de la expresión de moléculas B7 (CD80 y CD86) y CMH clase II (HLA-DR).

La expresión de las moléculas se observó con microscopía de fluorescencia (ver protocolo de técnica de Inmunofluorescencia para moléculas B7: CD80, CD86 y CMH II: HLA-DR).

### **Generación de NETs**

Para la generación de NETs se usaron los estimuladores de PMN neutrófilos ya citados clásicos (LPS, fMLP) y no clásico (OVA). Se tomaron muestras de los cultivos a diferentes tiempos, según la situación experimental, para observar la ocurrencia de NETs

Las NETs liberadas se visualizaron por microscopía de fluorescencia utilizando DAPI (4,6'-diamino-2-fenilindol (Sigma, St Louis, MO) para tinción del ácido desoxirribonucleico (ADN).

En las situaciones experimentales donde se usó Elastasa de neutrófilos (EN) con anticuerpo secundario anti-EN (ver protocolo de Inmunofluorescencia para EN), para la visualización de NETs, se tomaron muestras de cultivos a los 30 minutos y 120 minutos, luego de la estimulación con LPS.

### **Cuantificación de NETs**

Las NETs liberadas se visualizaron por microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberan los NETs se calculó como la media de seis campos (400x) normalizado con respecto al número total de células.

### **Inhibición de procesamiento y presentación antigénica, vía clase II (Abbas et al, 2012). (175)**

Tratamiento con cloroquina (Laboratorio Sanofi-Aventis) mediante el agregado de cloroquina en tiempo cero de cultivo, en concentración final de 0,1 mM. Se observó el efecto *in vitro* en la expresión de las moléculas del fenotipo CPA de PMN.

### **Técnica de preparación de Rosetas Macrófago Linfocitarias (RMLs) (Cabral y Novak, 1992; 1999). (146,147)**

Las células se obtuvieron de los cultivos de células de sangre periférica, mediante pipeta Pasteur, (previamente se realiza un suave agitación del recipiente de cultivo). Las muestras se llevaron a centrifugación a 200 x g, 10 minutos, con el agregado de solución fisiológica (lavado). Se resuspendieron las células sedimentadas en gotas de solución fisiológica y se colocaron sobre portaobjetos gotas de la citopreparación, en cámara húmeda, 5 minutos (sedimentación). Luego las citopreparaciones se sometieron a citodispersador suave para ser desecadas y adheridas al portaobjeto.

## **Cuantificación de RMLs**

Se consideró que se formó una RML cuando un monocito macrófago estaba rodeado por tres o más linfocitos. El número de rosetas (RML) se expresó como el porcentaje del número de macrófagos que formaron rosetas en una citopreparación dada mediante el recuento de 100 macrófagos.

## **Muestras para Inmunofluorescencia**

Los cubreobjetos de vidrio con células adheridas se retiraron cuidadosamente de la placa de cultivo y se realizaron técnicas para Inmunofluorescencia.

Otras muestras se tomaron a partir del cultivo en suspensión y se realizaron técnicas para Inmunofluorescencia.

## **Inmunofluorescencia para B7 (CD80, CD86) y CMH clase II (HLA-DR) (moléculas del fenotipo CPA)**

Las células cultivadas se lavaron brevemente en PBS, la fijación se realizó con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se lavó en tres oportunidades con PBS. Se incubó con suero de bloqueo de albúmina al 5 % en PBS, para evitar la tinción no específica durante 20 minutos. Se lavó con PBS. Se incubó con anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC; Santa Cruz Biotechnology), anti-CD86 (PE; Santa Cruz Biotechnology), anti-HLADR (FITC; Santa Cruz Biotechnology) a 4<sup>o</sup> C durante la noche. Se lavó con PBS y se realizó tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol) (Sigma, St Louis, MO). Se montaron las muestras con glicerol al 90% en PBS. La observación de las preparaciones se realizó en Vídeomicroscopio Axioscop 20, MC80, Trinocular, Carl Zeiss.

## **Inmunofluorescencia para EN**

Las células cultivadas se lavaron brevemente en PBS, la fijación se realizó con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se lavó en tres cambios en PBS. Se permeabilizó con Triton x-100 al 0,25% en PBS. Se incubó con suero de bloqueo de albúmina al 5 % en PBS para evitar la tinción no específica durante 20 minutos. Se lavó con PBS. Se incubó con un anticuerpo primario anti-EN (Abcam de conejo) durante una hora a 37<sup>o</sup> C, se lavó en PBS. Se

incubó durante una hora a 37° C con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor® 594 o con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína FITC (Santa Cruz Biotechnology). Se lavó con PBS y tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol) (Sigma, St Louis, MO). Se montó con glicerol al 90% en PBS. En todos los experimentos, el anticuerpo secundario solo sirvió como control negativo. La observación de las preparaciones se realizó en videomicroscopio Axioscop 20, MC80, trinocular, Carl Zeiss.

### **Inmunofluorescencia para CD4 y CD45RO**

Las células cultivadas se lavaron brevemente en PBS, la fijación se realizó con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se lavó en tres oportunidades con PBS. Se incubó con suero de bloqueo de albúmina al 5 % en PBS, para evitar la tinción no específica durante 20 minutos. Se lavó con PBS. Se incubó con anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD45RO (FITC; Santa Cruz Biotechnology), anti-CD4 (PE; Santa Cruz Biotechnology), a 4° C durante la noche. Se lavó con PBS y se realizó tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol) (Sigma, St Louis, MO). Se montaron las muestras con glicerol al 90% en PBS. La observación de las preparaciones se realizó en Videomicroscopio Axioscop 20, MC80, Trinocular, Carl Zeiss.

### **Microscopia óptica (MO). Técnica de Azul de Metileno, May Grünwald Giemsa, Hematoxilina.**

Citopreparaciones en extendidos obtenidos a partir de los ensayos fueron fijados en alcohol etílico se hidrataron con agua destilada. Se colorearon con Azul de Metileno o Hematoxilina, se dejó actuar cuatro minutos y el viraje se produjo con agua corriente. May Grünwald Giemsa: Se aplicó a los frotis secos solución de May-Grünwald durante 3 minutos. Se lavó en agua destilada, 3 minutos. Se aplicó solución de Giemsa 20 minutos. Se lavó con agua destilada.

### **Citopreparaciones para Microscopía Electrónica de transmisión (MET)**

Se prepararon sedimentos celulares con alícuotas de algunas muestras de cultivos de leucocitos totales autólogos. Se realizó fijación en glutaraldehído al 1 % en tampón cacodilato

0,1 M durante una hora y post fijación en  $\text{OsO}_4$  al 1 % en el mismo tampón, durante una hora. Luego los materiales se deshidrataron en acetonas de graduación creciente y se incluyeron en resina epoxi (Araldita) a  $60^\circ\text{C}$ , durante 24-48 hs. Posteriormente, se efectuaron cortes ultrafinos de 60 a 80 nm de espesor (color de interferencia plateado/dorado) que fueron recogidos en grillas de cobre de 250 barras por pulgada, contrastados con acetato de uranilo y citrato de Plomo y estudiados con Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss LEO-906E.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con test *t de Student* para muestras apareadas usando el software de licencia gratuita InfoStat.



## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

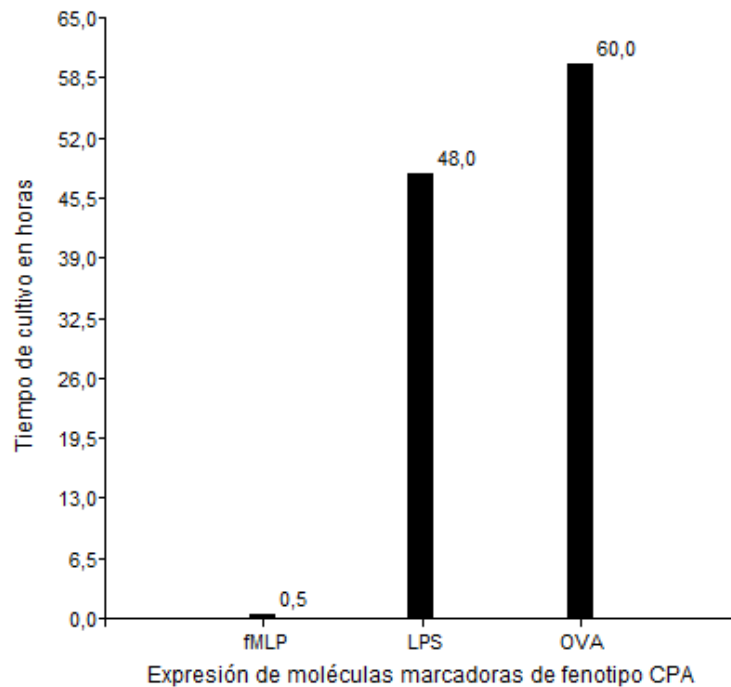
**Resultados respecto al objetivo N° 1:** generar *in vitro* fenotipos de PMN neutrófilos con estimulación clásica (LPS, fMLP) y no clásica (OVA). Estudiar la expresión de moléculas de superficie en los fenotipos generados (CD80, CD86 y HLA-DR) en cultivos de leucocitos totales autólogos y en PMN neutrófilos purificados. Estudiar la expresión de moléculas de superficie CD4 y CD45-RO en PMN neutrófilos purificados.

Se logró generar *in vitro* dos fenotipos de PMN neutrófilos con estimulación clásica y no clásica (**a.** el fenotipo “PMN neutrófilo-CPA”; **b.** el fenotipo “PMN neutrófilo-CD4-CD45RO”) y se logró visualizar la expresión de sus moléculas marcadoras.

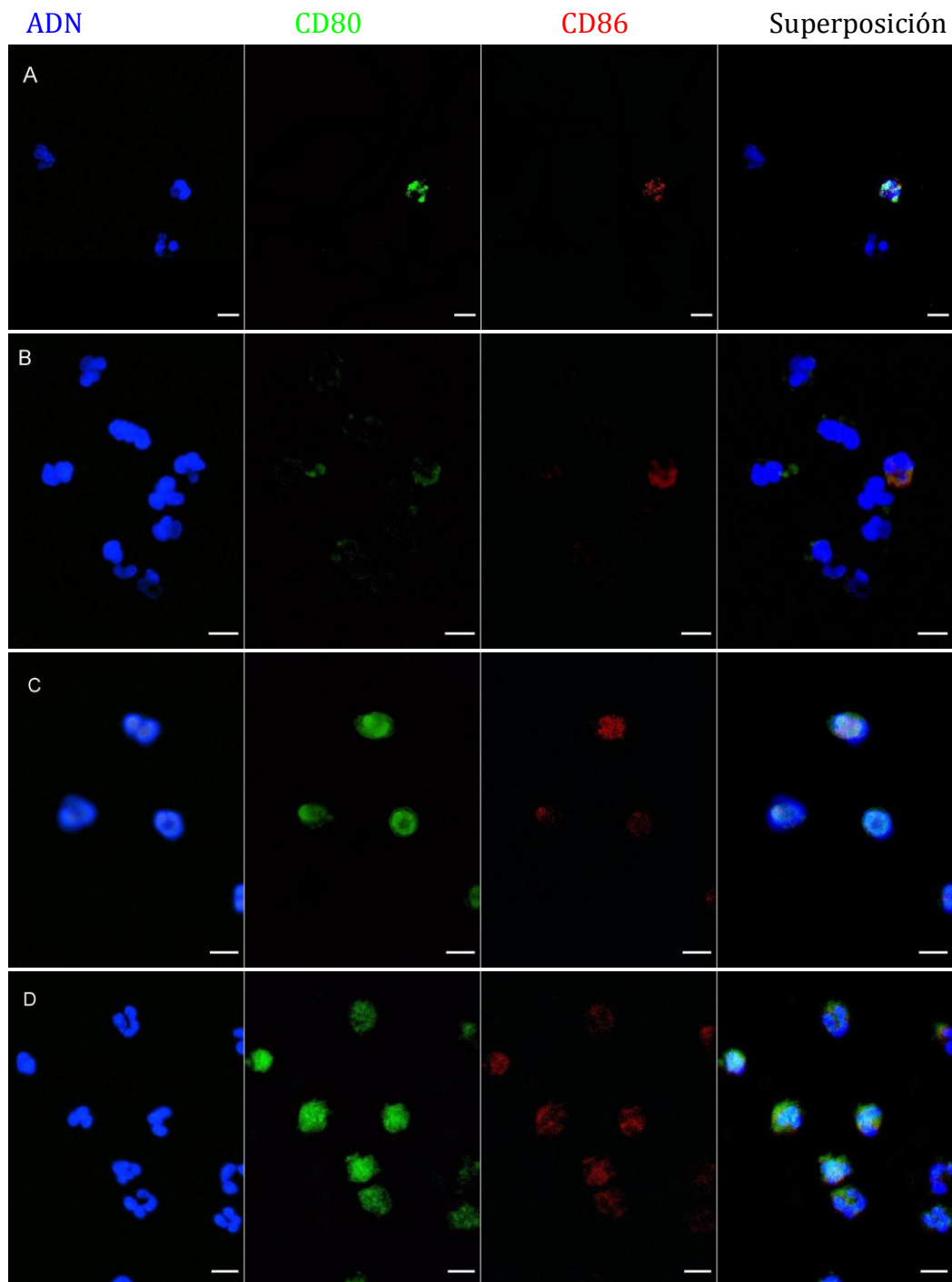
Ambos fenotipos inducidos *in vitro* con estimuladores surgen de la comparación con el “fenotipo PMN neutrófilo control”: de las muestras apareadas sin estimulación que 1) no expresa en superficie moléculas HLA-DR (CMH) y moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86); 2) puede expresar en algún grado moléculas no convencionales CD4 y CD45-RO; 3) es capaz de generar NETs (5%).

**a) Fenotipo “PMN neutrófilo-CPA”:** tanto en cultivos de leucocitos totales autólogos estimulados *in vitro* con LPS, fMLP u OVA como en cultivos de PMN neutrófilos purificados expresaron las moléculas coestimuladoras B7: CD80, CD86 y el CMH Clase II (HLA-DR), marcadoras del fenotipo CPA. (Figuras 8-16).

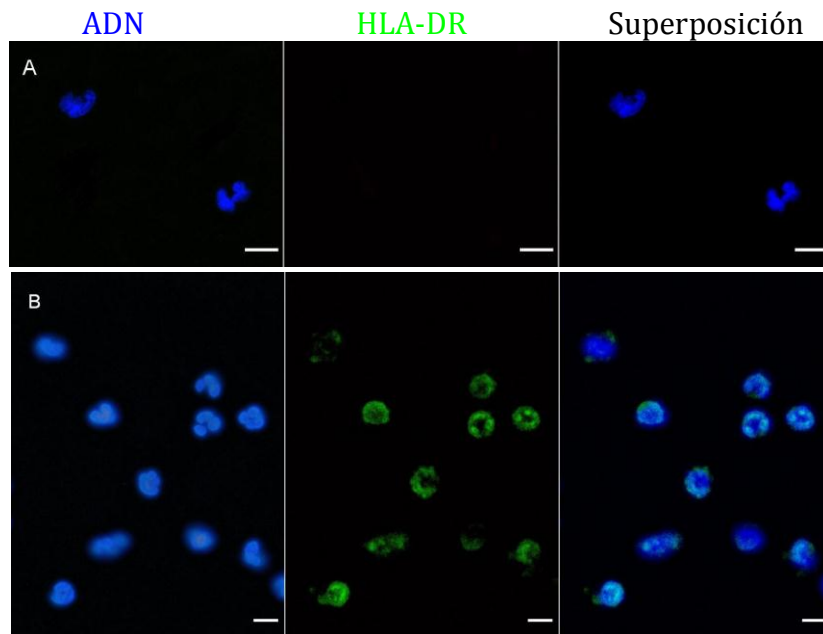
En los cultivos de PMN neutrófilos purificados estimulados con fMLP se observó expresión de las moléculas del fenotipo CPA hasta 30 minutos, en cultivos estimulados con LPS hasta 48 hs y en cambio, en los estimulados con OVA se observó la expresión hasta 60 hs de cultivo (Figura 8).



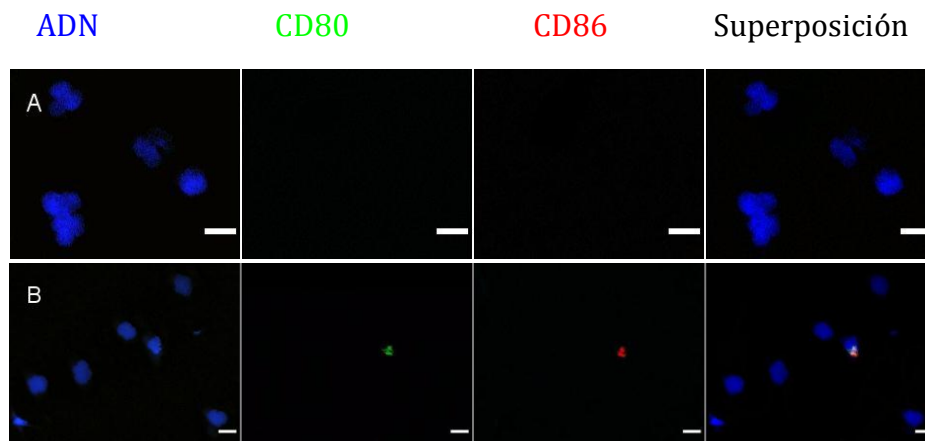
**Figura 8. Tiempo de expresión de moléculas marcadoras (B7: CD80 y CD86 y HLA-DR: CMH II) del fenotipo PMN neutrófilo CPA en cultivo de PMN neutrófilos purificados según estimuladores: fMLP, LPS u OVA.** Tiempo de cultivo en horas, estimulador agregado en tiempo cero, fMLP: expresión de moléculas marcadoras hasta 0,5 h; LPS: expresión de moléculas marcadoras hasta 48 hs y OVA: expresión de moléculas marcadoras hasta 60 hs.



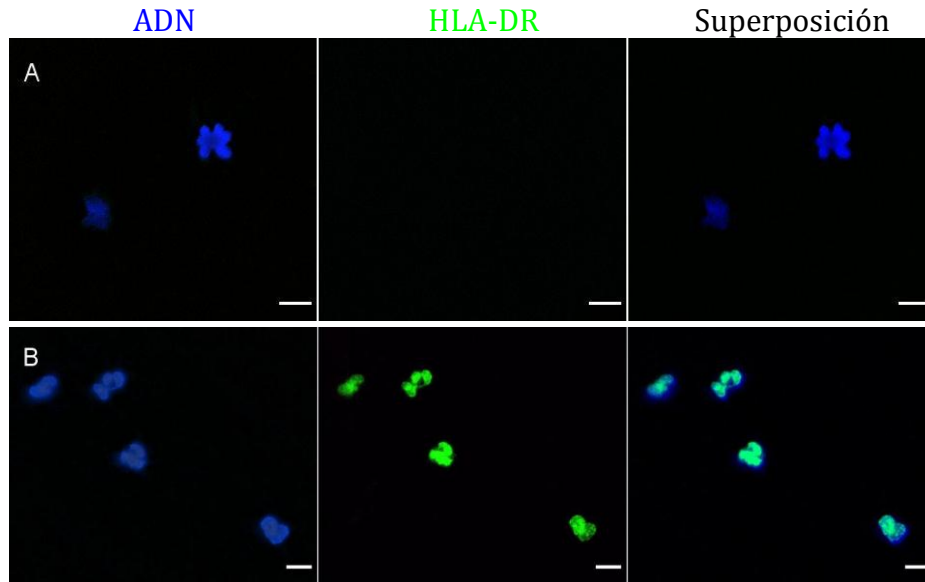
**Figura 9. Expresión en superficie de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con LPS. **C.** Estimulados con fMLP. **D.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de CD80 (verde), CD86 (rojo), y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.



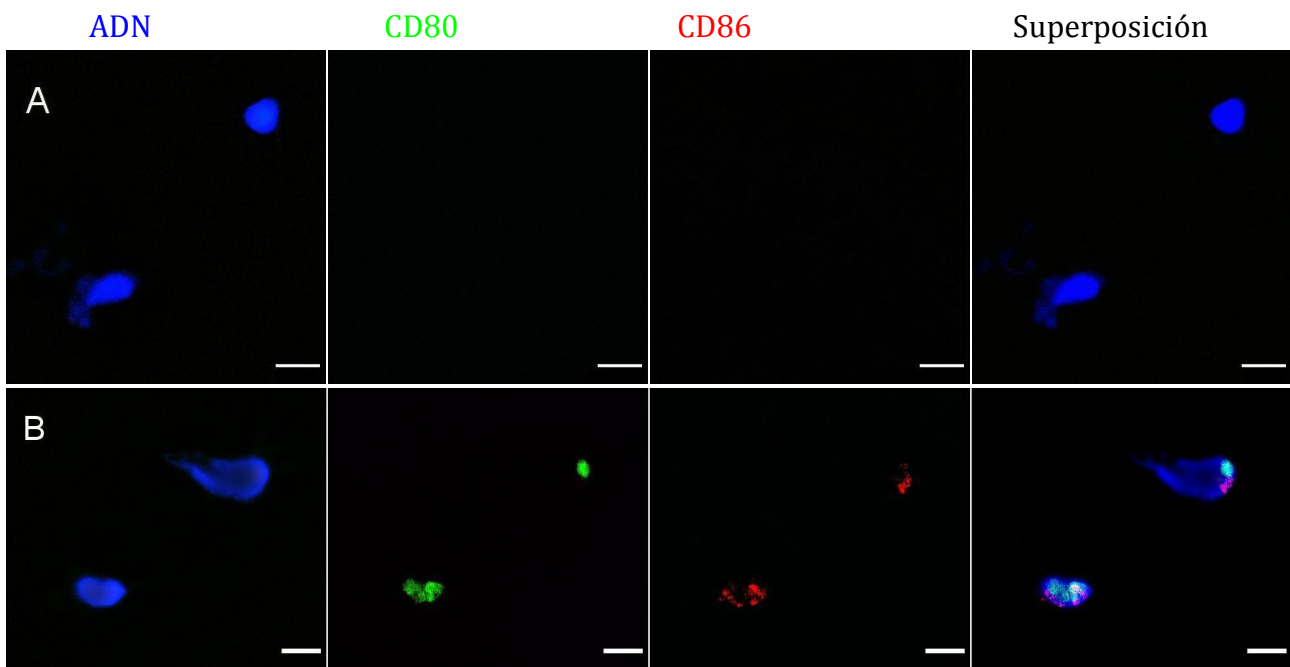
**Figura 10. Expresión en superficie de moléculas HLA-DR (CMH II) en cultivos de PMN neutrófilos purificados autólogos.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con LPS. Se observa ADN (azul), expresión de HLA-DR (verde) y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-HLA-DR(FITC), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.



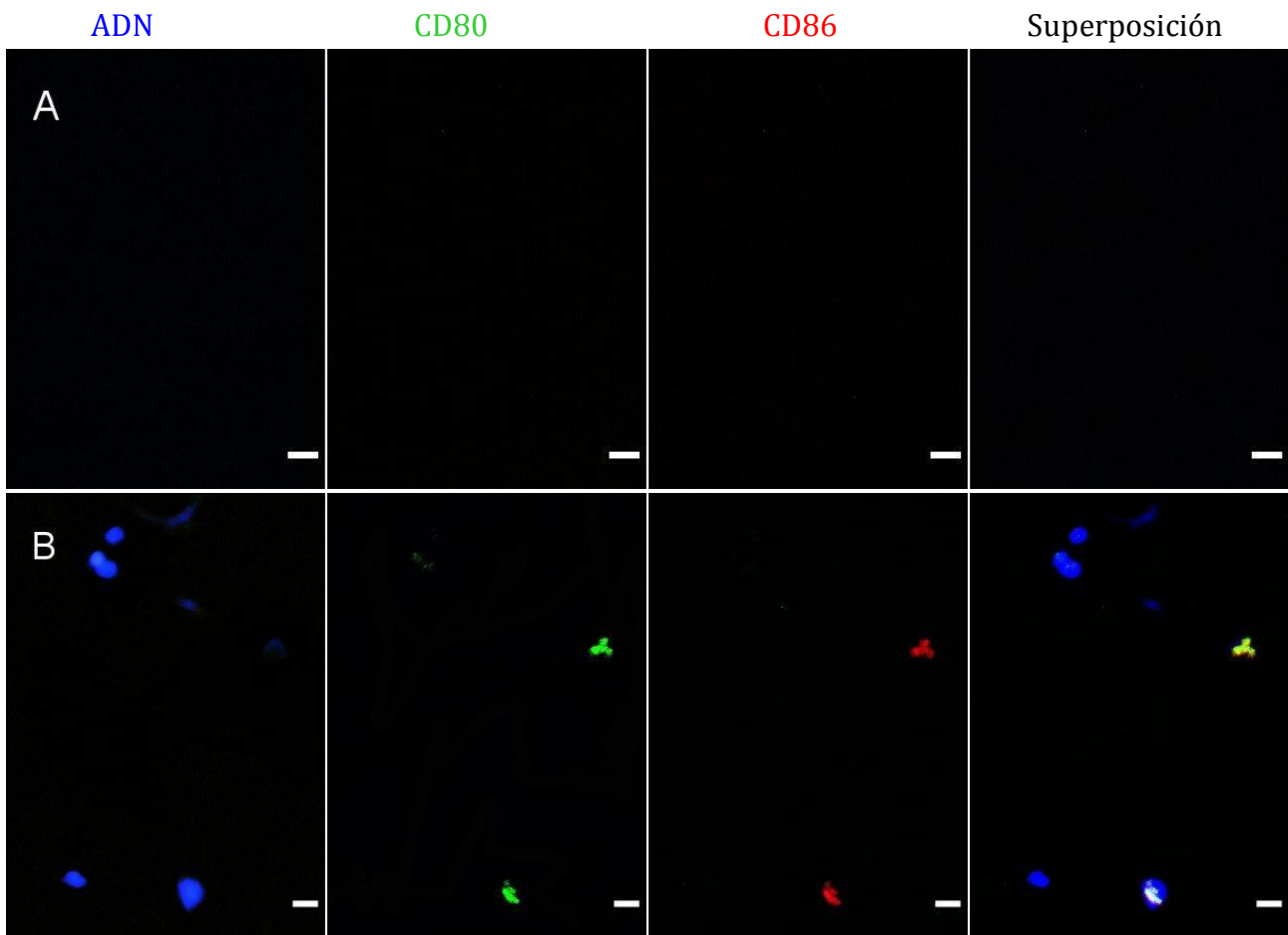
**Figura 11. Expresión en superficie de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 17 horas de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de CD80 (verde), CD86 (rojo) y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.



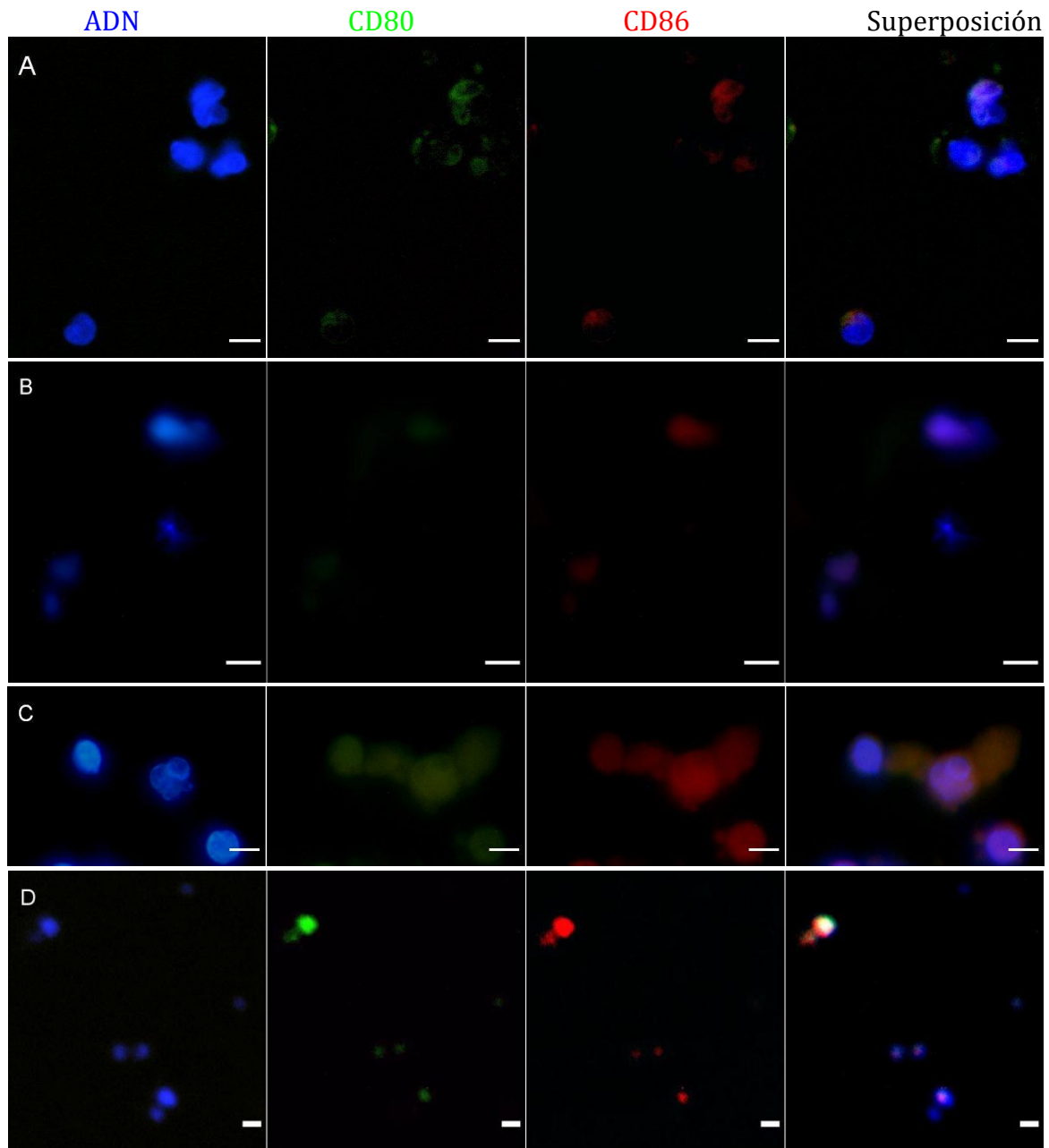
**Figura 12. Expresión en superficie de moléculas HLA-DR (CMH II) en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 17 horas de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de HLA-DR (verde) y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-HLA-DR(FITC), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.



**Figura 13. Expresión en superficie de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 48 horas de cultivo. **A.** Sin estimulación controles muestras apareadas. **B.** Estimulados con LPS. Se observa ADN (azul), expresión de CD80 (verde), CD86 (rojo), y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.

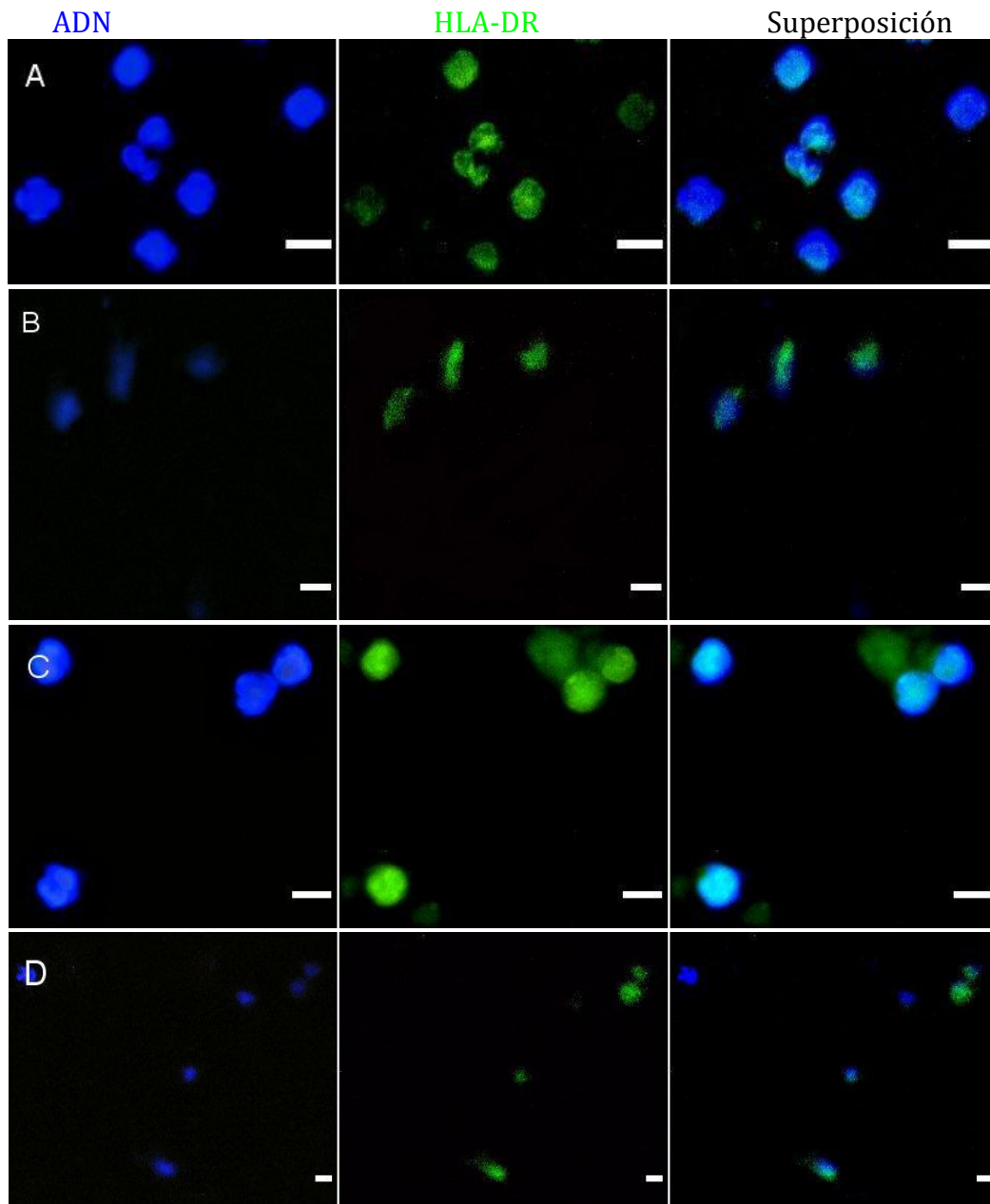


**Figura 14. Expresión en superficie de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 60 horas de cultivo. **A.** Sin estimulación controles muestras apareadas. **B.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de CD80 (verde), CD86 (rojo), y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 15. Expresión en superficie de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) en cultivos de leucocitos totales autólogos.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con LPS. **C.** Estimulados con fMLP. **D.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de CD80 (verde), CD86 (rojo) y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.

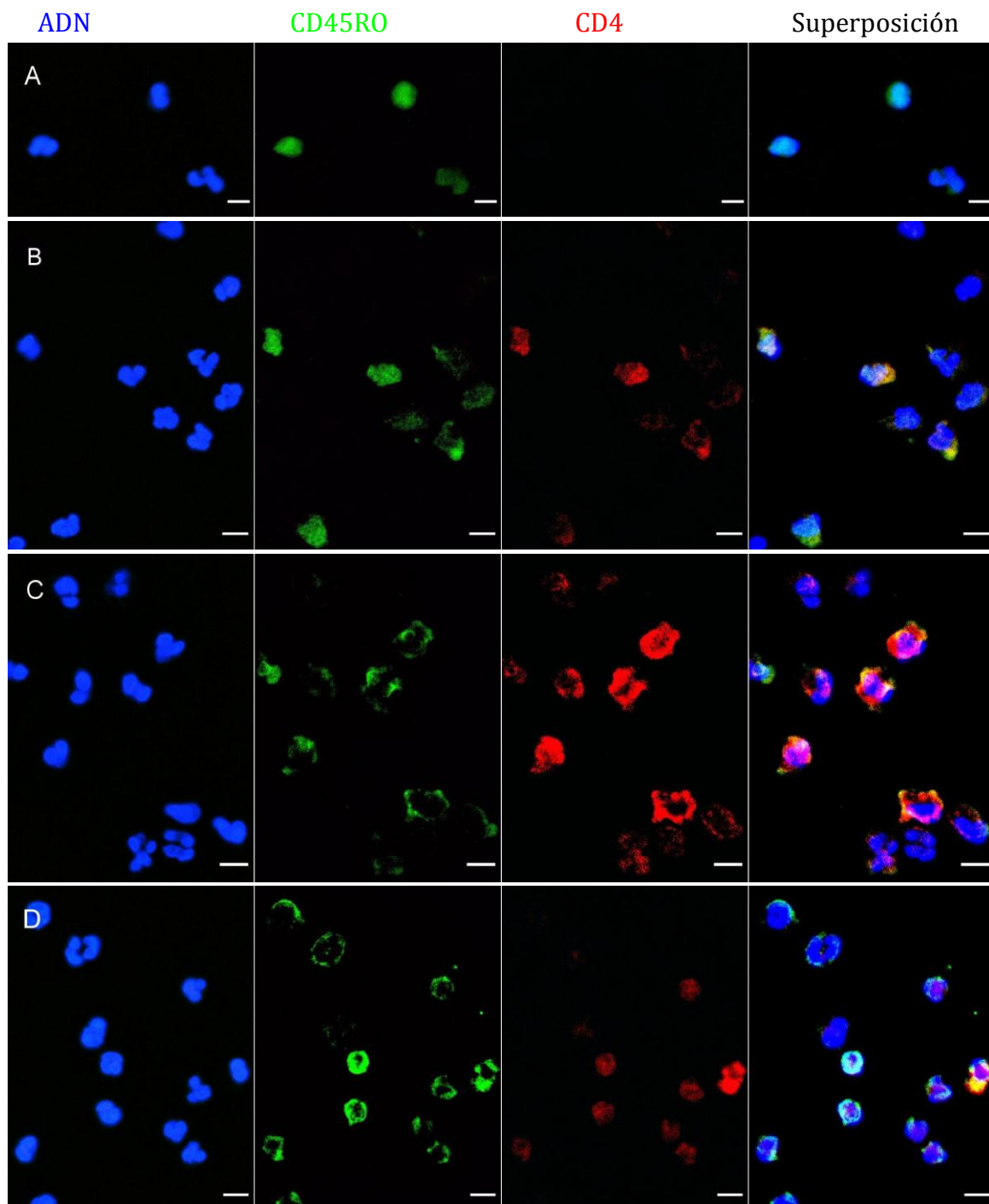




**Figura 16. Expresión en superficie de moléculas HLA-DR (CMH II) en cultivos de leucocitos totales autólogos.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con LPS. **C.** Estimulados con fMLP. **D.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de HLA-DR (verde) y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-HLA-DR(FITC), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.

**b) Fenotipo “PMN neutrófilo-CD4-CD45RO”:** PMN neutrófilos purificados estimulados *in vitro* con LPS, fMLP u OVA expresaron moléculas CD4 y CD45-RO en la superficie y en el citoplasma (Figura 17).

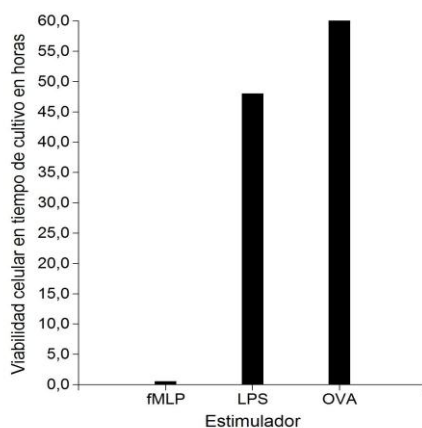
Con la estimulación de fMLP en comparación con los otros estimuladores se observó mayor expresión de la molécula CD4 e inversamente menor expresión de CD45-RO en los PMN neutrófilos purificados.



**Figura 17. Expresión en superficie de moléculas CD45RO y CD4 en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con LPS. **C.** Estimulados con fMLP. **D.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de CD45RO (verde), CD4 (rojo), y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD45RO (FITC), anti-CD4 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

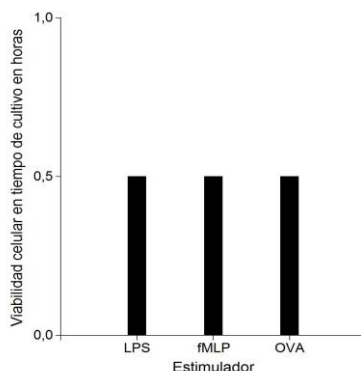
**Resultados respecto al objetivo N° 2:** determinar el tiempo de vida *in vitro* de los fenotipos generados.

En relación al tiempo de vida *in vitro* del *fenotipo PMN neutrófilo CPA* (técnica Azul Tripan): en cultivos de muestras apareadas controles los PMN neutrófilos purificados se observaron viables hasta 30 minutos. En los cultivos PMN neutrófilos estimulados con fMLP se observaron viables hasta 30 minutos. En cultivos estimulados con LPS se observaron células viables hasta 48 hs de cultivo, en cambio con OVA se observaron viables hasta 60 hs de cultivo, expresando las moléculas del fenotipo CPA (Figura 18).



**Figura 18. Tiempo de viabilidad celular del *fenotipo PMN neutrófilo CPA* en cultivo según estimuladores: fMLP, LPS u OVA.** Tiempo de cultivo en horas, estimulador agregado en tiempo cero. fMLP: 30 minutos. LPS: 48 hs. OVA: 60 hs. Cultivo autólogo de PMN neutrófilos purificados.

En relación al tiempo de vida *in vitro* del *fenotipo PMN neutrófilo CD4, CD45-RO* (Técnica Azul Tripan) se observaron viables hasta 30 min de cultivo. (Figura 19)



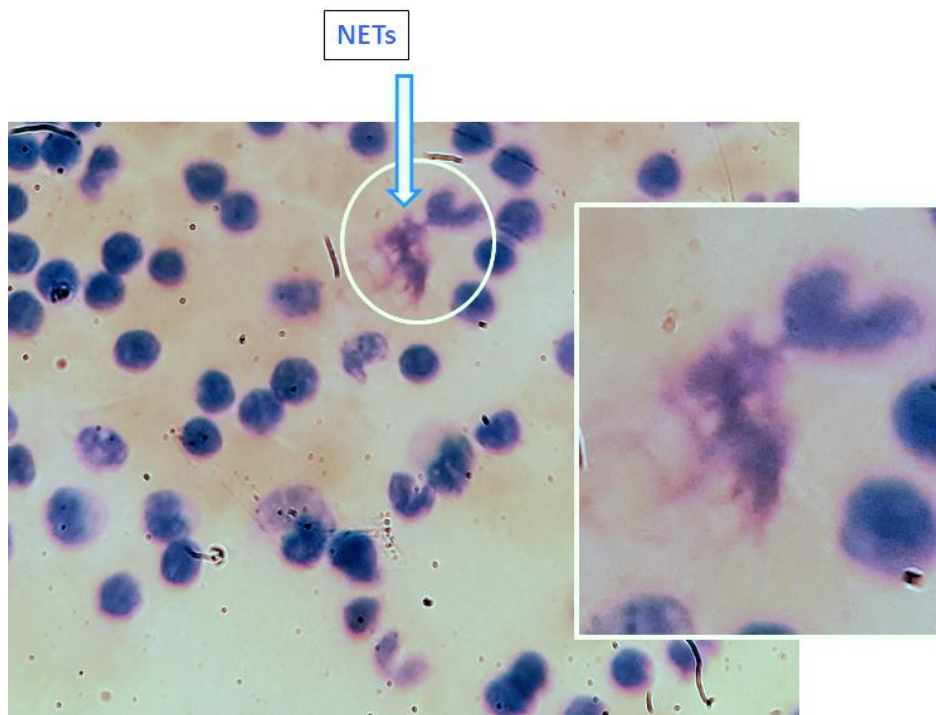
**Figura 19. Tiempo de viabilidad celular del *fenotipo PMN neutrófilo CD4-CD45RO* en cultivo según estimuladores: LPS, fMLP u OVA.** Tiempo de cultivo en horas, estimulador agregado en tiempo cero. LPS: 30 minutos. fMLP: 30 minutos. OVA: 30 minutos. Cultivo autólogo de PMN neutrófilos purificados.

**Resultados respecto al objetivo N° 3:** provocar la generación de NETs en PMN neutrófilos purificados y en cultivos de leucocitos totales autólogos con estimuladores clásicos (LPS, fMLP) y con uno no clásico (OVA) y estudiar la expresión de moléculas relacionadas al fenotipo de CPA del PMN neutrófilo y de moléculas CD4 y CD45-RO en las NETs.

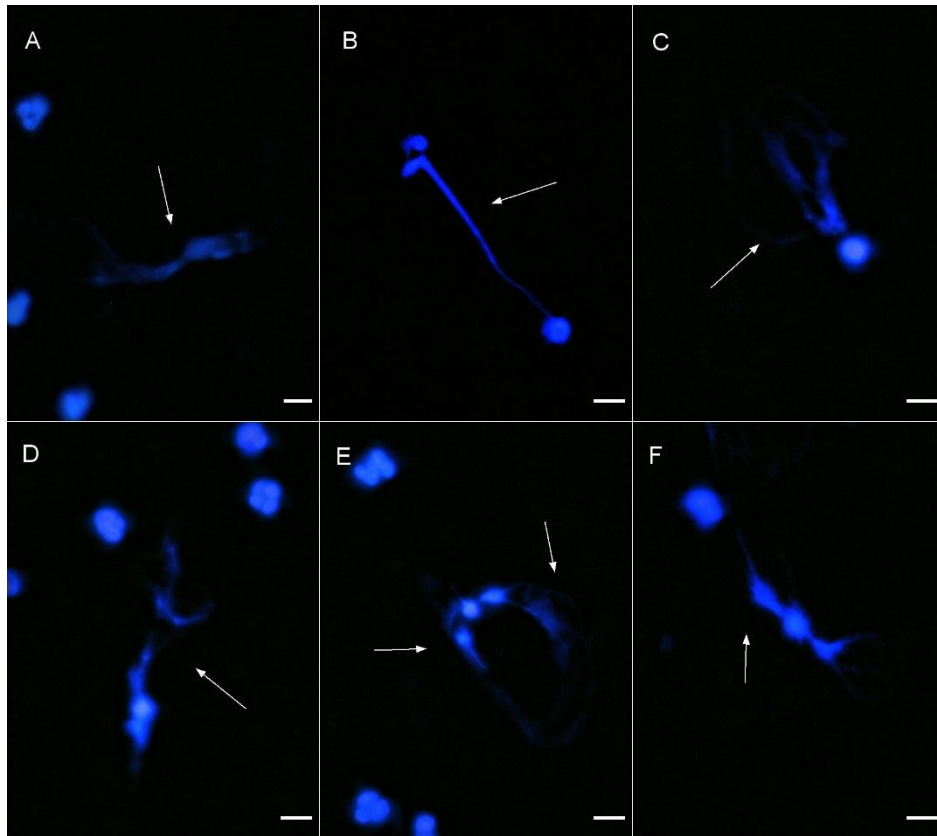
1. Teniendo en cuenta el objetivo N° 3 **se logró provocar la generación de NETs** en PMN neutrófilos purificados y en cultivos de leucocitos totales autólogos con estimuladores clásicos y uno no clásico. Además se observó en muestras apareadas controles sin estimulación la formación de NETs en 5 % de las células.

En imágenes de microscopía óptica, puede observarse el ADN extruído del PMN neutrófilo en forma de fibrillas (Figura 20).

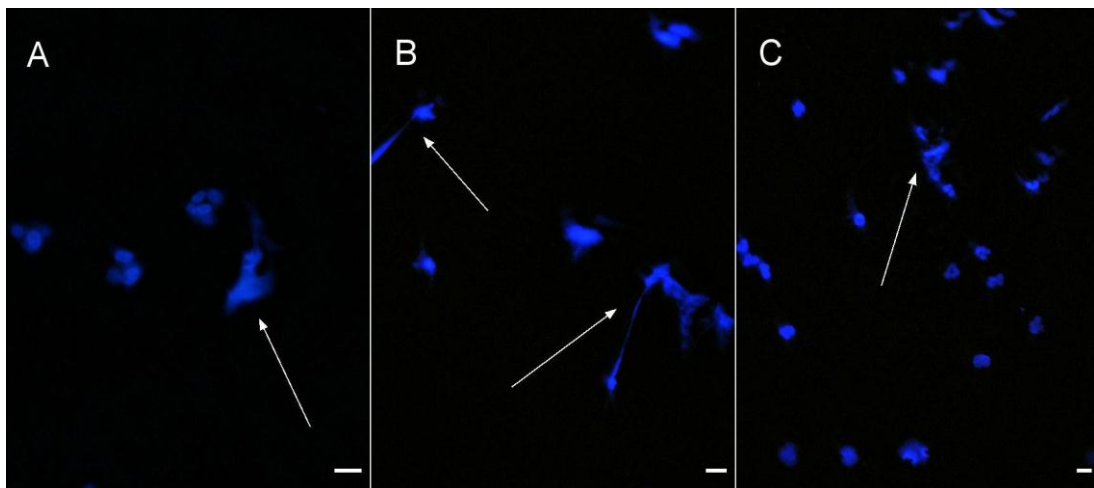
La presencia de NETs fue claramente demostrada por la tinción del ADN mediante inmunofluorescencia con DAPI. Las NETs se visualizan como tinción difusa del DAPI, o bien como numerosas fibrillas o en aspecto de “spray” (Figuras 21 y 22).



**Figura 20. NETs observadas con MO.** Microfotografía óptica representativa de cultivos de leucocitos totales autólogos estimulados con LPS. 30 minutos de cultivo. Tinción Azul de Metileno. 1000x y ampliación en recuadro. La flecha señala NETs.



**Figura 21. NETs en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. Tinción de ADN con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10 µm. Las flechas indican NETs. **A.** NET observada en muestra control de cultivos de PMN purificados autólogos controles. **B-F.** NETs en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados estimulados con LPS.

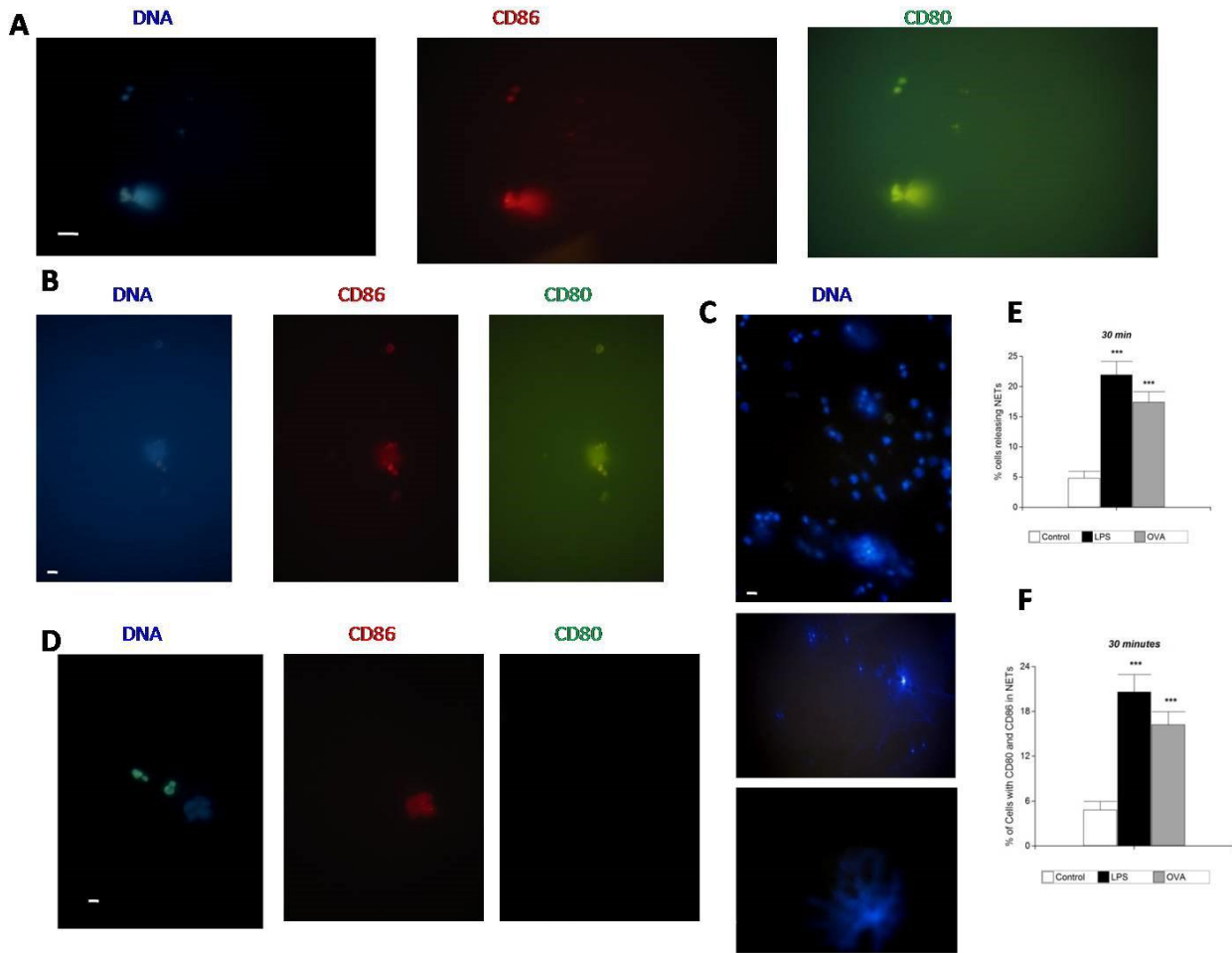


**Figura 22. NETs generadas por estimuladores clásicos y uno no clásico desde tiempo cero de cultivo.** Imagen representativas de microscopía de inmunofluorescencia de cultivos de PMN neutrófilos purificados autólogos estimulados. **A.** Estimulación con fMLP, 30 minutos de cultivo. **B.** Estimulación con LPS, 48 hs de cultivo. **C.** Estimulación con OVA (estimulador no clásico), 17 hs de cultivo. Se observa el ADN (azul) liberado por los PMN neutrófilos. Tinción del ADN con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10 µm. Las flechas indican NETs.

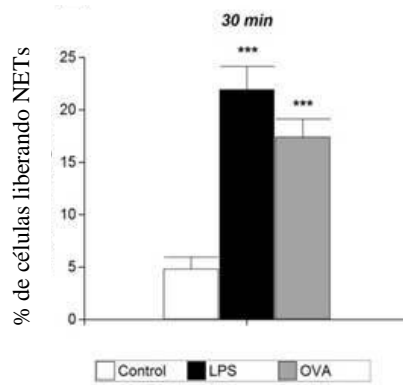
2. Además teniendo en cuenta también el objetivo N°3 se estudió la **expresión en NETs de las moléculas marcadoras de los distintos fenotipos: 2a) En el fenotipo PMN neutrófilo CPA:** Se observaron moléculas B7 (CD80 y CD86), HLA-DR (CMH II) en las NETs liberadas por el *fenotipo PMN neutrófilo CPA* (Figuras 23-29, 31-33). **2b) En el fenotipo PMN neutrófilo CD4, CD45-RO:** se observaron moléculas CD4 y CD45-RO en las NETs liberadas por el *fenotipo PMN neutrófilo CD4, CD45-RO*.

**2a) En el fenotipo PMN neutrófilo CPA:** Se observaron moléculas B7 (CD80 y CD86), en las NETs liberadas por el *fenotipo PMN neutrófilo CPA* (Figuras 23-29, 31-33).

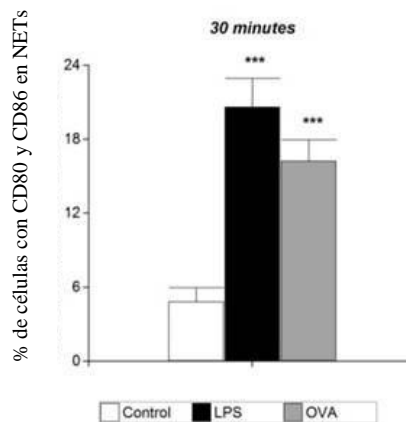
## Cultivos de leucocitos totales autólogos



**Figura 23. Moléculas coestimuladoras B7:CD80 y CD86 co-localizadas en NETs en cultivos de leucocitos totales después de la estimulación durante 30 minutos.** Análisis de inmunofluorescencia, imágenes representativas de tres experimentos independientes de donantes. La barra de escala representa 10 μm. **A.** Imágenes compuestas representativas de microscopía de fluorescencia que muestran CD80 (verde) y CD86 (rojo). Imágenes obtenidas tras la estimulación con LPS durante 30 minutos. **B.** Imágenes obtenidas después de la estimulación con OVA durante 30 minutos que muestran CD80 (verde) y CD86 (rojo) co-localizadas en NET. **C.** Imágenes representativas obtenidas después de la estimulación con LPS durante 30 minutos, ADN teñido con DAPI (azul). **D.** Imagen representativa obtenida sin estimulación (control de muestras de sangre apareadas). ADN teñido con DAPI, CD80 (verde) y CD86 (rojo). **E.** Células estimuladas con LPS o bien con OVA durante 30 minutos. Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberaron NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados con respecto al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio ± SD de n = 10 y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\* p < 0,001 por la prueba *t de Student* para muestras apareadas. **F.** Células con estimulación con LPS o bien con OVA durante 30 minutos. Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberan NETs con CD80 y CD86 co-localizadas en NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio ± SD de n = 10 y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\* p < 0,001 por prueba *t de Student* para muestras apareadas.



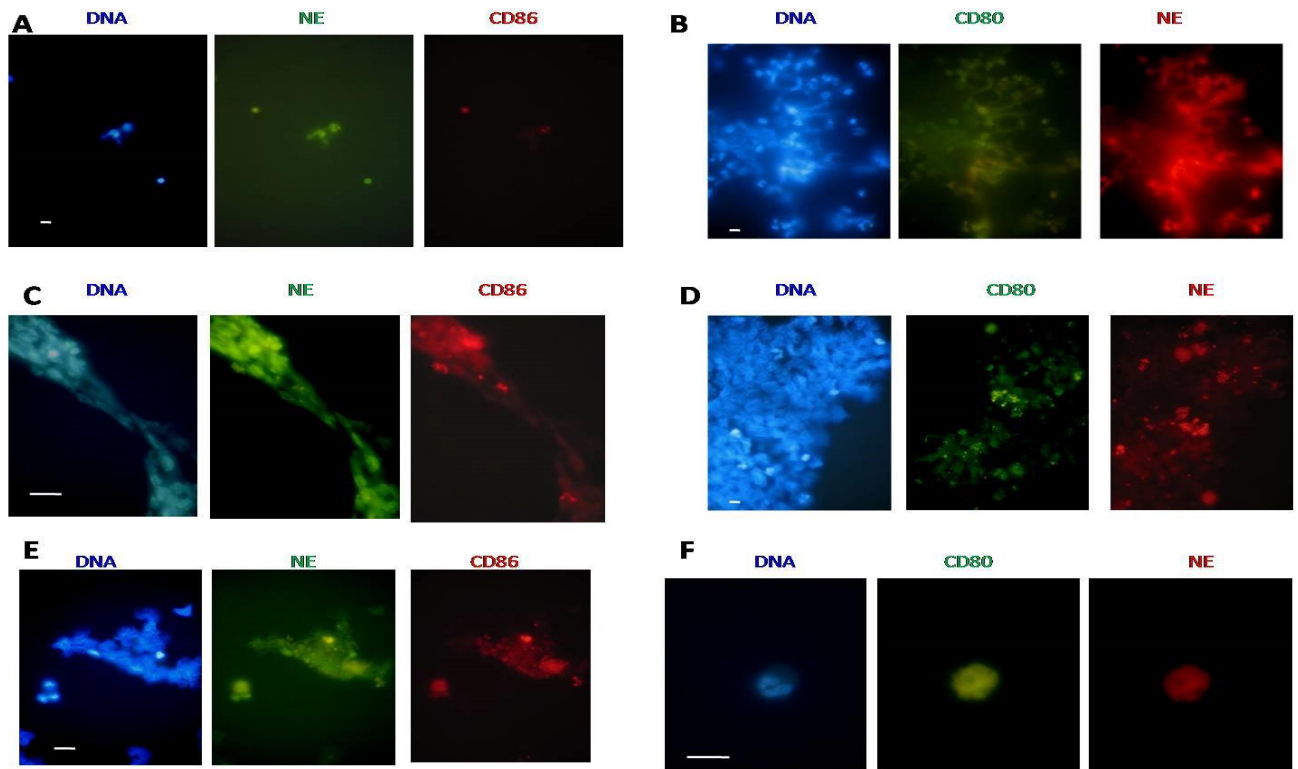
**Figura 24. Ampliado de la Figura 23E. Porcentaje de células que liberan NETs en cultivos de leucocitos totales.** Células estimuladas con LPS u OVA durante 30 minutos. Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberan NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados con respecto al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD de  $n = 10$  y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\*  $p < 0,001$  por prueba *t de Student* para muestras apareadas.



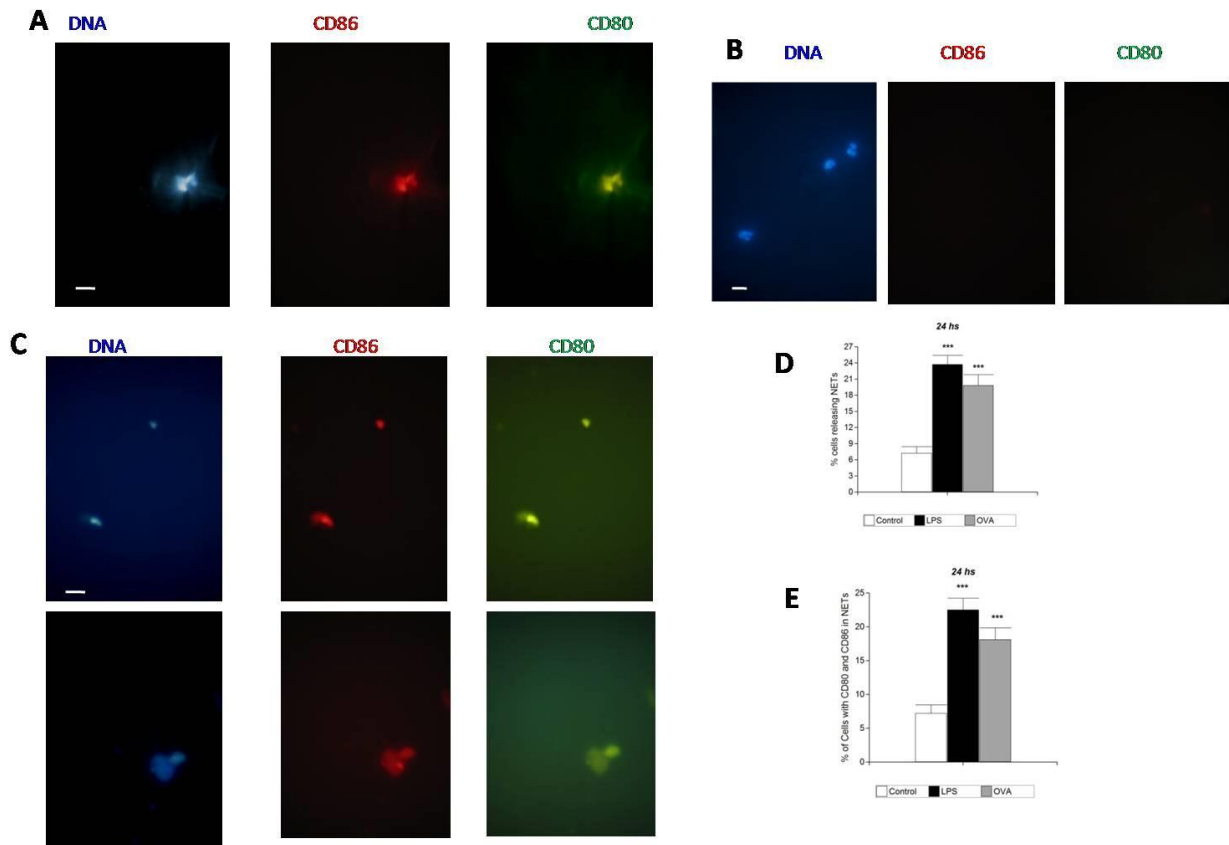
**Figura 25. Ampliado de la Figura 23F. Porcentaje de células con moléculas B7 CD80 y CD86 en NETs en cultivos de leucocitos totales.** Células con estimulación con LPS o bien con OVA durante 30 minutos. Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberan NETs con CD80 y CD86 co-localizadas en NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD de  $n = 10$  y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\*  $p < 0,001$  por prueba *t de Student* para muestras apareadas.



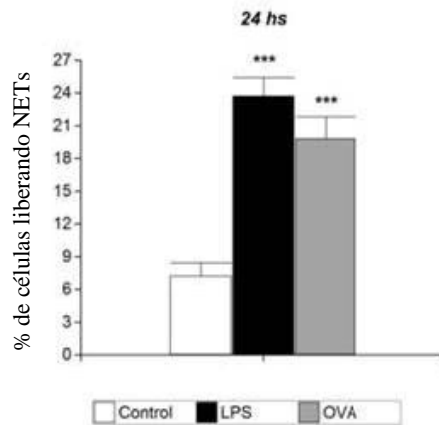
En los experimentos con cultivos de leucocitos totales se utilizó a la EN, enzima específica del PMN neutrófilo, como marcador de NETs. En los controles apareados la EN a los 120 minutos se observó dentro de las células y en los ensayos con LPS a los 120 minutos la EN se colocalizó con las moléculas B7 CD80 y CD86 en las NETs (Figura 26).



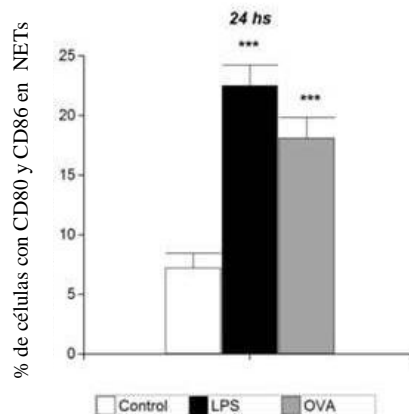
**Figura 26. Análisis de inmunofluorescencia de EN y moléculas coestimuladoras B7: CD80 y CD86 en cultivos de leucocitos totales autólogos.** Imágenes representativas de tres experimentos independientes de donantes. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ . **A.** Imágenes obtenidas después de la estimulación con LPS durante 30 minutos. ADN teñido con DAPI (azul), CD86 (rojo) y EN (verde). **B.** Imágenes obtenidas después de la estimulación con LPS durante 120 minutos. ADN teñido con DAPI (azul), CD80 (verde) y EN (rojo) co-localizadas en NETs. **C.** Imágenes obtenidas después de la estimulación con LPS durante 120 minutos que muestran EN (verde) y CD86 (rojo) co-localizadas en NETs. **D.** Imagen representativa obtenida sin estimulación (muestras de sangre controles apareadas) a los 120 minutos del tiempo de cultivo. ADN teñido con DAPI, CD80 (verde) y EN (rojo). **E.** Imagen representativa obtenida sin estimulación (muestras controles apareadas) a los 120 minutos del tiempo de cultivo. ADN teñido con DAPI, EN (verde) y CD86 (rojo). **F.** Imagen representativa de PMN neutrófilo obtenida sin estimulación (muestras controles apareadas) a los 120 minutos del tiempo de cultivo. ADN teñido con DAPI, CD80 (verde) y EN (rojo).



**Figura 27. Moléculas coestimuladoras B7: CD80 y CD86 co-localizadas en NETs en cultivos de leucocitos totales autólogos después de la estimulación durante 24 horas.** Análisis de inmunofluorescencia, imágenes representativas de tres experimentos independientes de donantes. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ . **A.** Imágenes compuestas representativas de microscopía de fluorescencia que muestran moléculas B7: CD80 y CD86 co-localizadas en NETs. ADN teñido con DAPI (azul), CD80 (verde) y CD86 (rojo). Imágenes obtenidas tras la estimulación con LPS durante 24 horas. **B.** Imagen representativa obtenida sin estimulación (muestras de sangre controles apareadas). ADN teñido con DAPI, CD80 (verde) y CD86 (rojo). **C.** Imágenes representativas compuestas obtenidas después de la estimulación con OVA durante 24 horas, mostrando CD80 (verde) y CD86 (rojo) co-localizadas en NETs. **D.** Células con estimulación con LPS o bien con OVA durante 24 horas. Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberaron NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados con respecto al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD de  $n = 10$  y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba *t de Student* para muestras apareadas. **E.** Células con estimulación con LPS o bien con OVA durante 24 horas. Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberan NETs con CD80 y CD86 co-localizadas en NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD de  $n = 10$  y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\*  $p < 0,001$  por prueba *t de Student* para muestras apareadas.

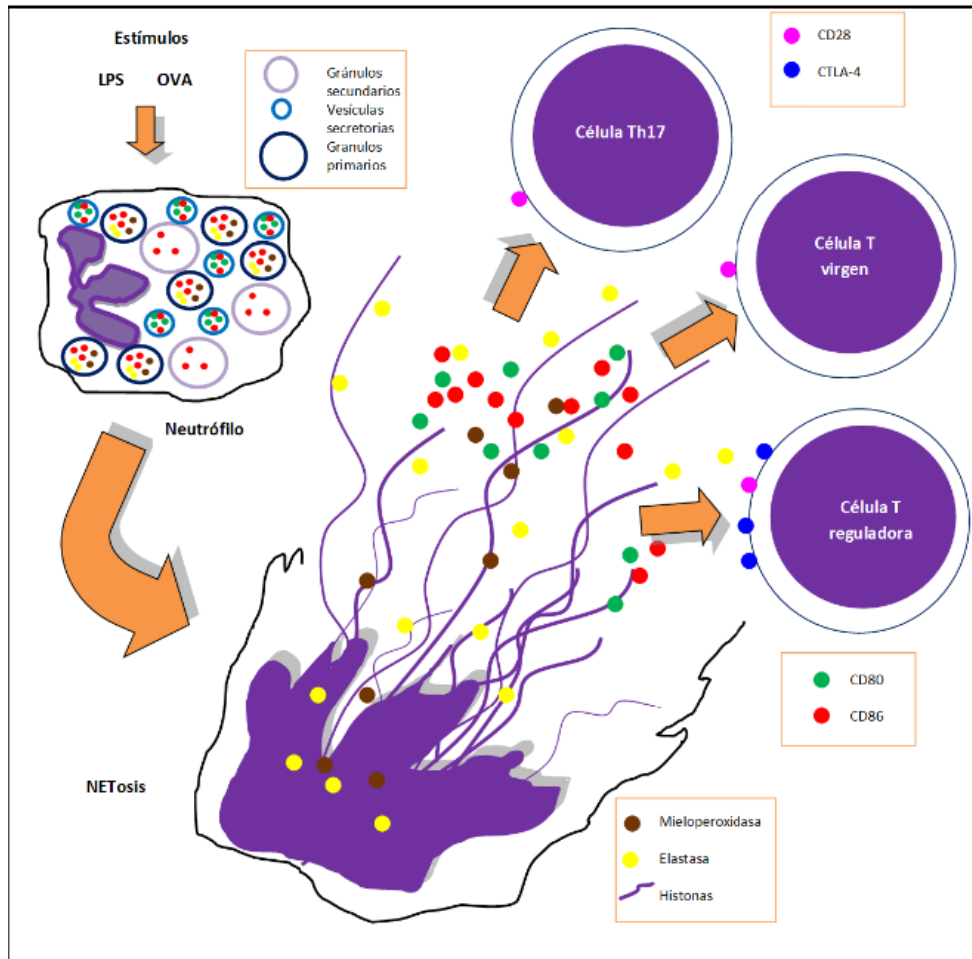


**Figura 28. Ampliado de la Figura 27D. Porcentaje de células que liberan NETs en cultivos de leucocitos totales autólogos. Células con estimulación con LPS o bien con OVA durante 24 horas.** Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberaron NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados con respecto al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD de  $n = 10$  y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba *t de Student* para muestras apareadas.



**Figura 29. Ampliado de la Figura 27E. Porcentaje de células que liberan NETs con moléculas B 7 CD80 y CD86 en NETs en cultivos de leucocitos totales autólogos. Células con estimulación con LPS o bien con OVA durante 24 horas.** Las NETs liberadas se visualizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia y el porcentaje de células que liberan NETs con CD80 y CD86 co-localizadas en NETs se calculó como el promedio de seis campos (400x) normalizados al número total de células. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD de  $n = 10$  y representaron al menos tres experimentos independientes de donantes. \*\*\*  $p < 0,001$  por prueba *t de Student* para muestras apareadas.

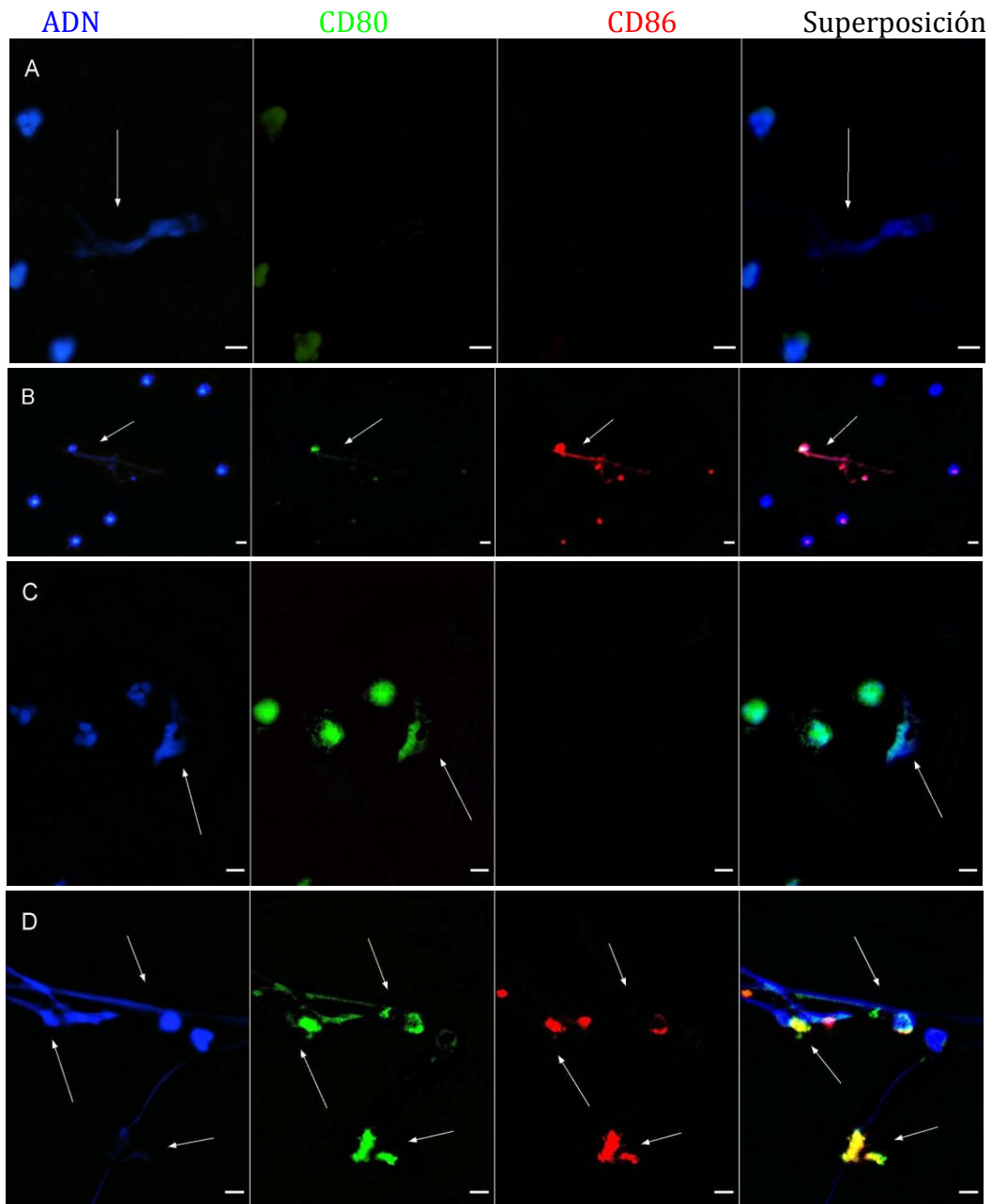
A través de la siguiente figura (Figura 30) se intenta esquematizar la liberación de NETs conteniendo las moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) y su posible influencia sobre las subpoblaciones de células T en un cultivo de leucocitos totales autólogos:



**Figura 30. Esquema de PMN neutrófilos estimulados con LPS u OVA que generan NETs conteniendo las moléculas B7 CD80 y CD86. Influencia de moléculas B7 contenidas en las NETs sobre subpoblaciones de células T.** PMN neutrófilo contiene gránulos y vesículas secretoras con moléculas B7 preformadas. Generación de NETs en cultivos de leucocitos autólogos, estimulados con lipopolisacárido (LPS) u ovoalbúmina (OVA). Esto podría permitir que los PMN neutrófilos ejerzan funciones como CPA y funciones moduladoras de varias subpoblaciones de células T (efectoras, vírgenes, de memoria, reguladoras). La presencia de CD80 y CD86 en NET podría influir en el entorno celular a través de la vía B7-1 / B7-2: CD28 /CTLA-4.

### ***Cultivos de PMN neutrófilos purificados***

PMN neutrófilos purificados, luego de estimulación con LPS, fMLP y OVA, expresaron moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86 en las NETs (Figura 31).

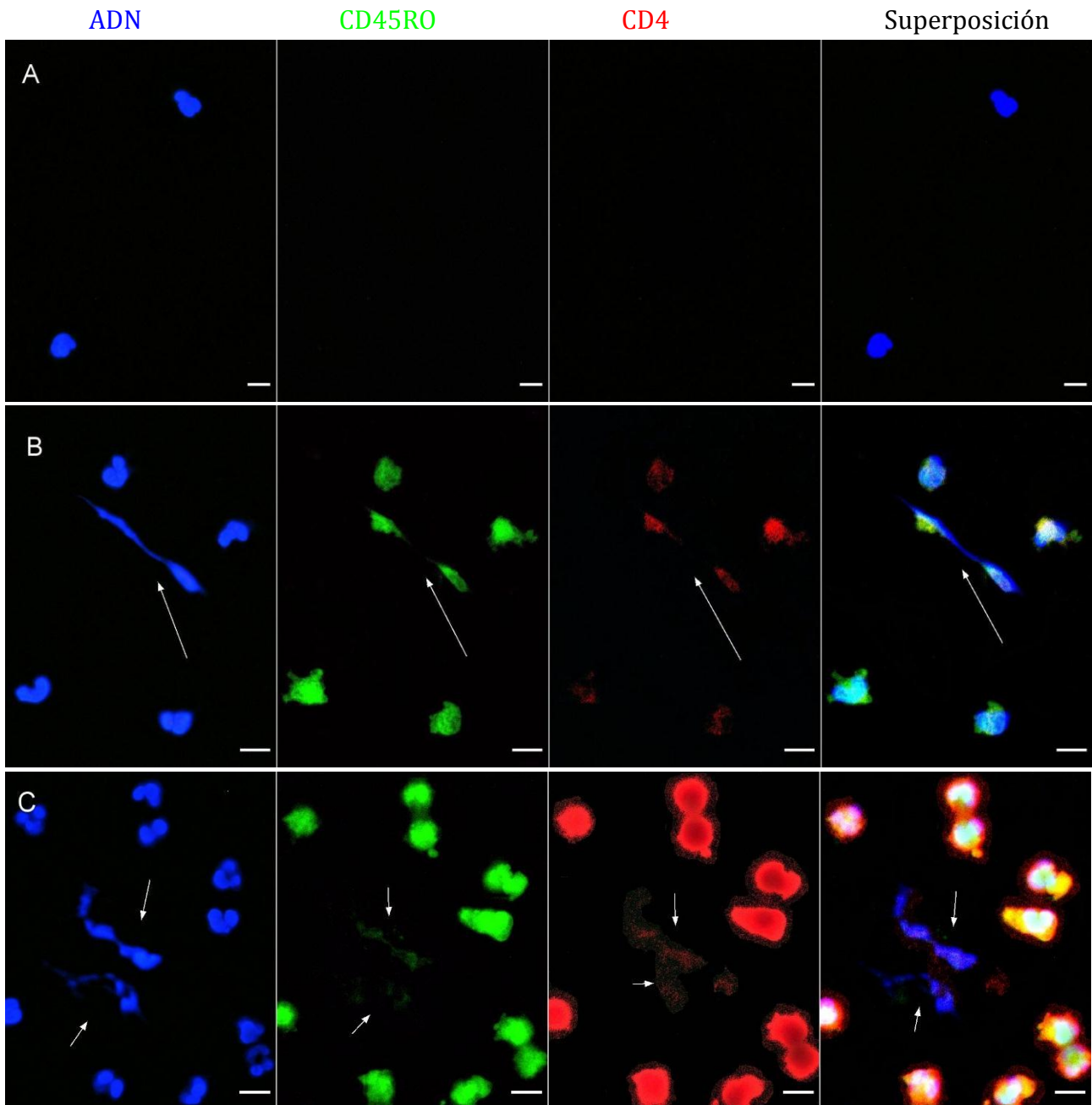


**Figura 31. Moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) en NETs en cultivos de PMN neutrófilos autólogos purificados.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. **A.** Sin estimulación, muestras controles apareadas. **B.** Estimulados con LPS. **C.** Estimulados con fMLP. **D.** Estimulados con OVA. Se observa ADN (azul), expresión de CD80 (verde), CD86 (rojo) y superposición (*merge*). Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Las flechas indican NETs.

Teniendo en cuenta también el objetivo N°3 como se dijo, se estudió la **expresión de las moléculas en NETs.**

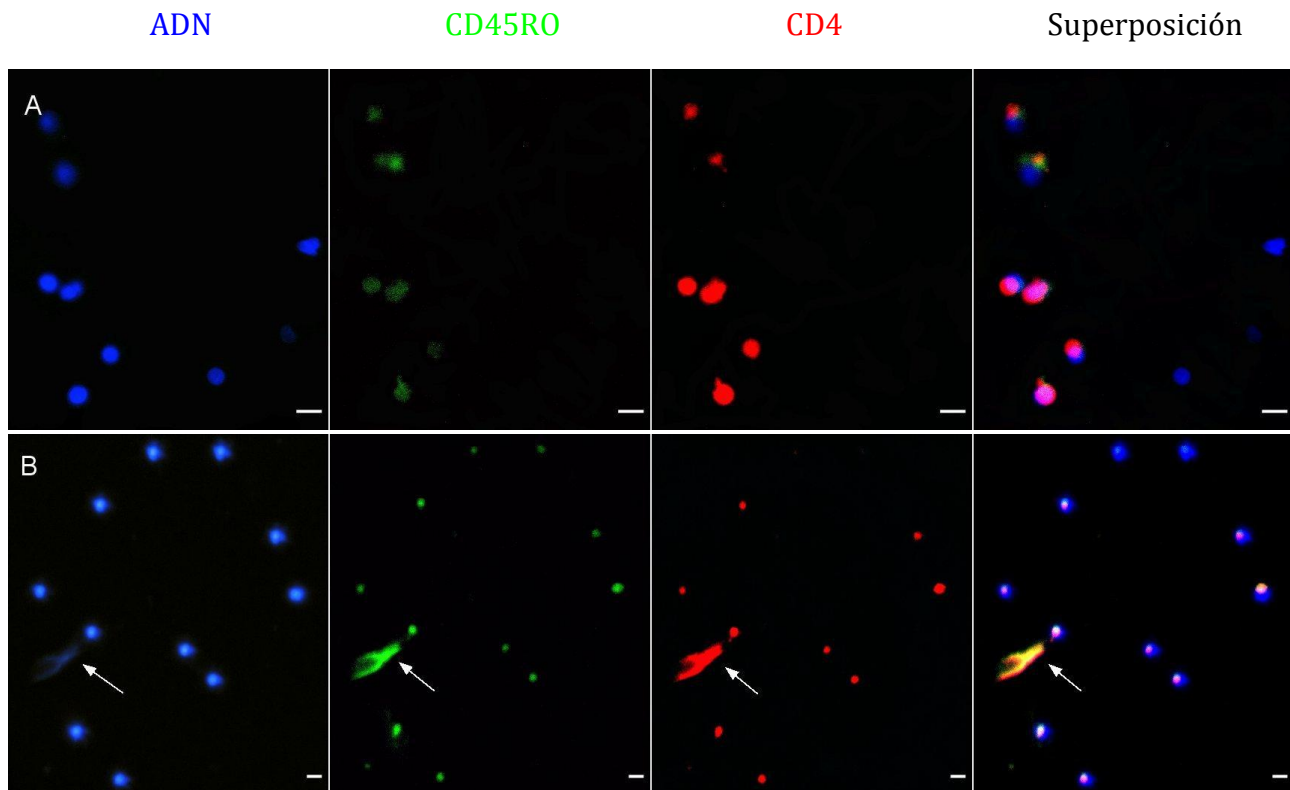
**2b) En el fenotipo *PMN neutrófilo CD4, CD45-RO*:** se observaron moléculas CD4 y CD45-RO en las NETs liberadas por el *fenotipo PMN neutrófilo CD4, CD45-RO*.

Se observaron PMN neutrófilos que liberan NETs conteniendo las moléculas CD4 y CD45RO, luego de la estimulación con LPS o con fMLP durante 30 minutos en cultivos de PMN neutrófilos purificados (Figura 32).



**Figura 32. Expresión de CD4 y CD45RO en NETs.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia de **cultivos de PMN purificados autólogos**. 30 minutos de cultivo. **A.** Controles apareados sin estimular. **B.** Estimulados con LPS. **C.** Estimulados con fMLP. Se observa el ADN (azul) liberado por los neutrófilos y la expresión de CD45RO (verde), CD4 (rojo) en las NETs. Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD45RO (FITC), anti-CD4 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Las flechas indican NETs.

Se efectuaron co-cultivos autólogos de PMN neutrófilos purificados estimulados con LPS durante 30 minutos y leucocitos MN purificados estimulados con OVA, 30 minutos. Se observó la ocurrencia de NETs en los co-cultivos con moléculas CD4 y CD45-RO co-localizadas en las NETs (Figura 33).

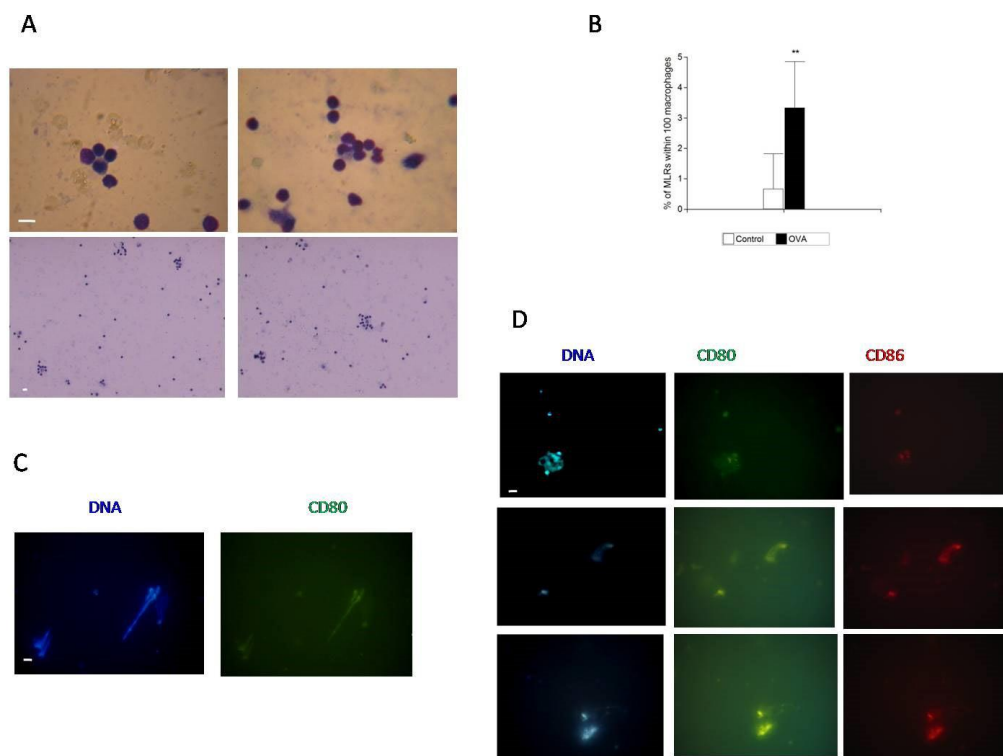


**Figura 33. Expresión de CD4 y CD45RO en NETs.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia de **co-cultivos autólogos de PMN neutrófilos purificados y MN purificados**. **A.** Controles apareados sin estimulación. **B.** PMN neutrófilos purificados estimulados con LPS y MN purificados estimulados con OVA. 30 minutos de cultivo. Se observa el ADN (azul) liberado por los neutrófilos y la expresión de CD45RO (verde), CD4 (rojo) en las NETs. Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD45RO (FITC), anti-CD4 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). Las flechas indican NETs. La barra de escala representa 10  $\mu$ m. Las flechas indican NETs.

**Resultados respecto al objetivo N° 4:** estudiar la ocurrencia de Sinapsis Inmunológicas (modelo RML con y sin antígeno heterólogo: OVA y con y sin inhibidor de procesamiento y presentación antigénica vía Clase II: cloroquina) en presencia de PMN neutrófilos con fenotipo CPA.

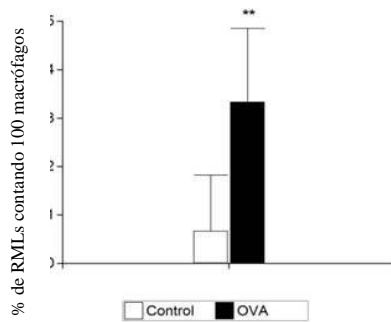
Teniendo en cuenta el objetivo N° 4 se observó el **incremento de la ocurrencia de SI** tipo RMLs **en presencia del fenotipo PMN neutrófilo-CPA** generado *in vitro* por estimulación con OVA **que libera NETs** conteniendo moléculas coestimuladoras B7:CD80 y CD86 (Figura 34).

Cultivos autólogos de leucocitos totales fueron estimulados con el agregado de OVA como antígeno heterólogo, a las 24 hs de cultivo se observó ocurrencia de RMLs en presencia de neutrófilos que liberan NETs conteniendo moléculas B7: CD80 y CD86. Se observó un alto número de RMLs en los ensayos estimulados con OVA comparados con los controles sin OVA. El análisis estadístico con *test t de Student* para muestras apareadas mostró diferencias significativas  $p < 0,01$  (Figura 35). En las mismas muestras apareadas se observó por inmunofluorescencia moléculas B7 CD80 y CD86 co-localizadas en NETs.



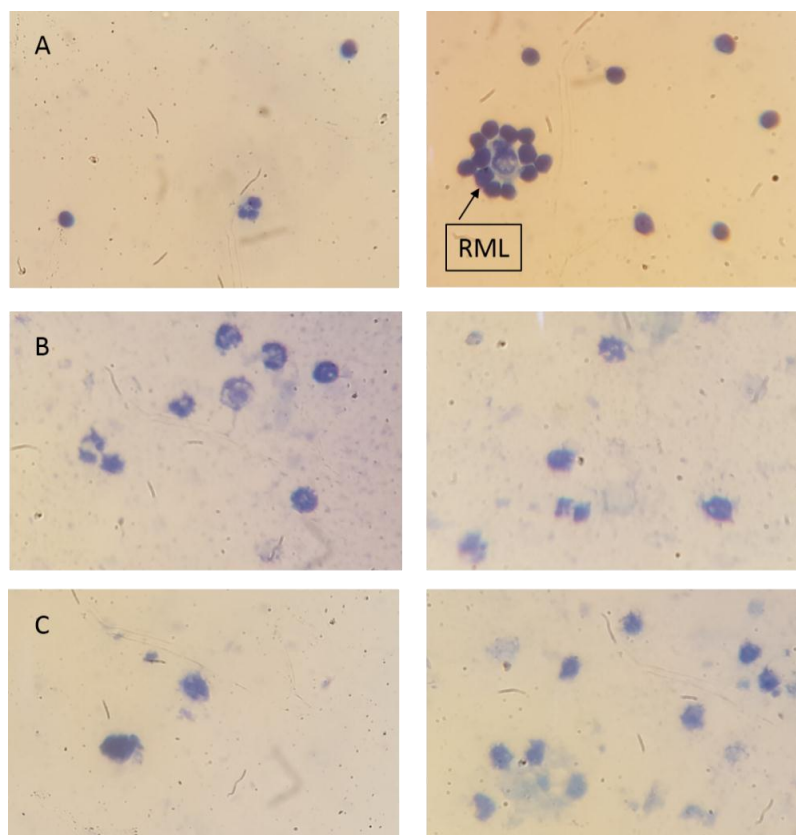
**Figura 34. Moléculas coestimuladoras B7:CD80 y CD86 co-localizadas en NETs y Ensayo de SI en RML con adición de antígeno heterólogo y estimulador no clásico OVA en cultivos de leucocitos totales autólogos.** **A.** Imágenes representativas compuestas de microscopía óptica que muestran RML en muestras de cultivos de leucocitos autólogos después de la estimulación con antígeno heterólogo OVA durante 24 h. Las citopreparaciones se tiñeron con May Grünwald Giemsa o Azul de Toluidina. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Gráfico del ensayo de RML de monocitos-macrófagos con estimulación con antígeno heterólogo OVA durante 24 h. Se consideró que se formaba una roseta macrófago-linfocitaria (RML) cuando un monocito-macrófago estaba rodeado por tres o más linfocitos. El número de RLM se expresó como el porcentaje del número de macrófagos que formaron rosetas en una citopreparación determinada al contar 100 macrófagos. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) \*\*  $p < 0,01$  mediante la prueba *t de Student* para muestras apareadas utilizando el software Infostat. **C.** Imágenes representativas compuestas de NETs en microscopía de fluorescencia que muestran CD80 (verde), ADN teñido con DAPI (azul) en muestras de cultivos de leucocitos autólogos después de la estimulación con antígeno heterólogo OVA durante 24 hs y ensayo RML. **D.** Imágenes representativas compuestas de microscopía de fluorescencia que muestran CD80 (verde) y CD86 (rojo), ADN teñido con DAPI (azul) en muestras de cultivos de leucocitos autólogos después de la estimulación con antígeno heterólogo OVA durante 24 hs y ensayo RML. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .





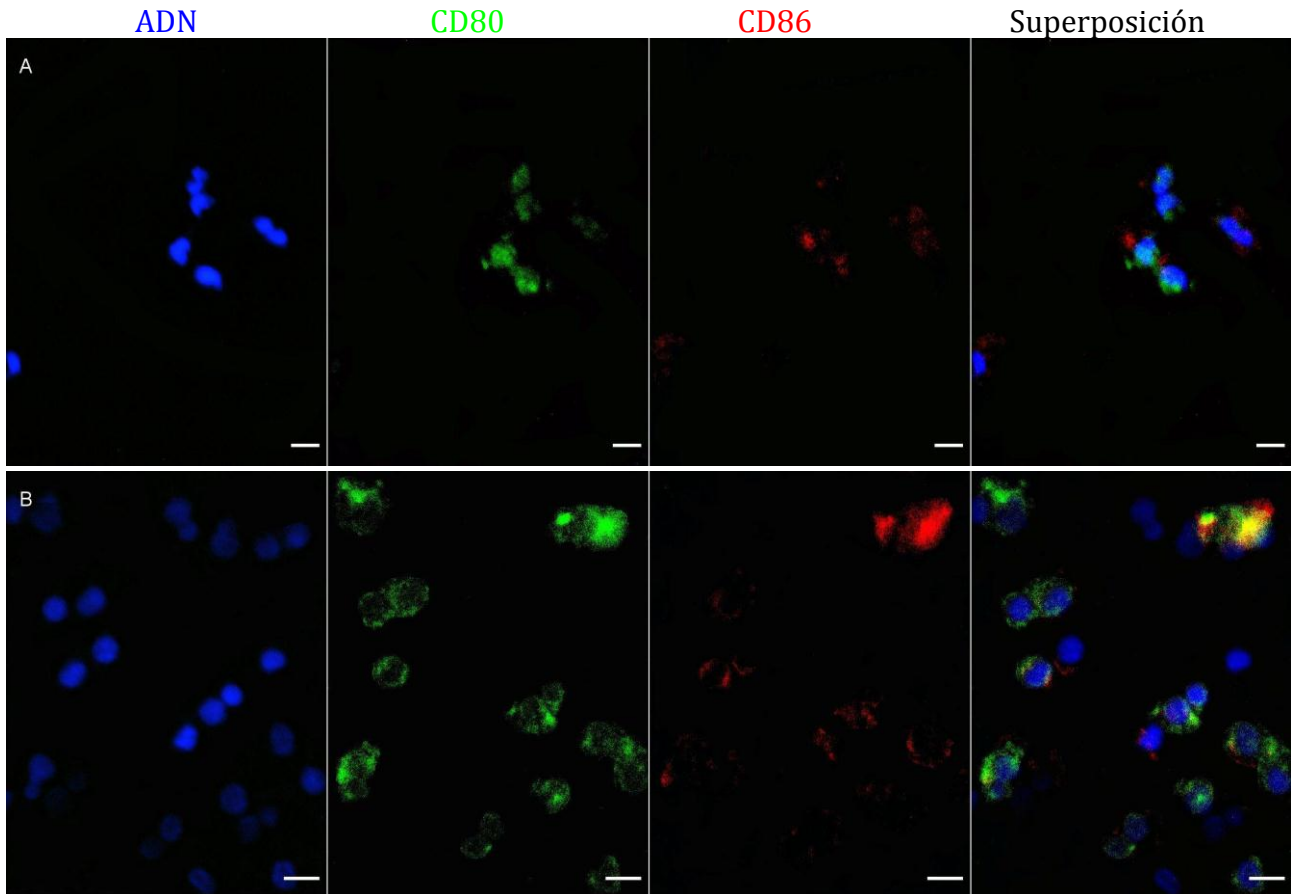
**Figura 35. Ampliado de la Figura 34D. Porcentaje de RML. Ensayo de rosetas macrófago-linfocitarias (RML) con estimulación con OVA durante 24 hs en cultivos de leucocitos totales autólogos.** Se consideró que se formaba una RML cuando un macrófago monocito estaba rodeado por tres o más linfocitos. El número de RMLs se expresó como el porcentaje del número de macrófagos que formaron rosetas en una citopreparación determinada al contar 100 macrófagos. Los datos se presentaron como el valor medio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) \*\*  $p < 0,01$  mediante la prueba *t de Student* para muestras apareadas utilizando el software Infostat.

El efecto del inhibidor de procesamiento y presentación de antígenos vía Clase II *cloroquina* sobre SI en RML resultó en la no formación de rosetas (Figura 36).



**Figura 36. Efecto del inhibidor de procesamiento y presentación antigénica vía Clase II: cloroquina en SI en RMLs, 48 horas de cultivo.** Microfotografías ópticas representativas de cultivos de leucocitos totales autólogos. **A.** Estimulados con antígeno heterólogo y estimulador no clásico OVA donde puede observarse la presencia de RML. **B.** Efecto de cloroquina, donde no se observa el fenómeno RML. **C.** Estímulo con antígeno heterólogo y estimulador no clásico OVA y efecto de cloroquina, tampoco se constata la presencia de RMLs. Tinción Azul de Metileno. 400x.

Por otra parte, el efecto del inhibidor de procesamiento y presentación de antígenos vía Clase II *cloroquina* sobre la expresión de las moléculas marcadoras del *fenotipo PMN neutrófilo CPA* resultó en similar expresión de moléculas B7 (CD80 y CD86) (Figura 37).

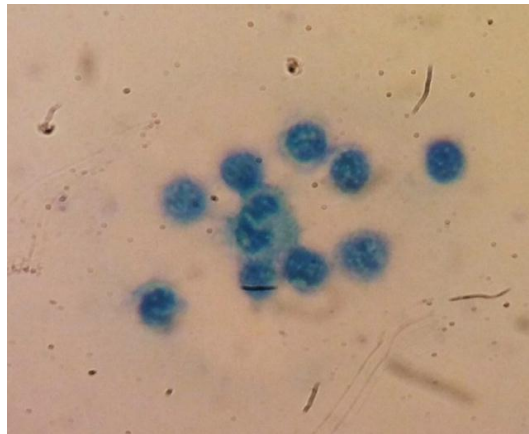


**Figura 37. Efecto del inhibidor de procesamiento y presentación antigénica vía Clase II: cloroquina. Expresión en superficie de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) en cultivos de leucocitos totales autólogos estimulados con antígeno heterólogo OVA.** Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia. 30 minutos de cultivo. Se observa ADN (azul) y expresión de CD80 (verde), CD86 (rojo), y superposición (*merge*). **A.** Muestras apareadas controles con OVA sin cloroquina. **B.** Muestras de cultivo de leucocitos totales autólogos estimulados con OVA y agregado del inhibidor cloroquina. Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE), tinción nuclear con DAPI (4,6'-diamidino-2-fenilindol). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.

**Resultados respecto al objetivo N° 5:** estudiar la ocurrencia de interacciones celulares de contacto entre linfocitos y PMN neutrófilos con MO y MET.

Se observaron a través de MO y MET interacciones celulares de contacto entre PMN neutrófilos y linfocitos en cultivos de leucocitos totales autólogos.

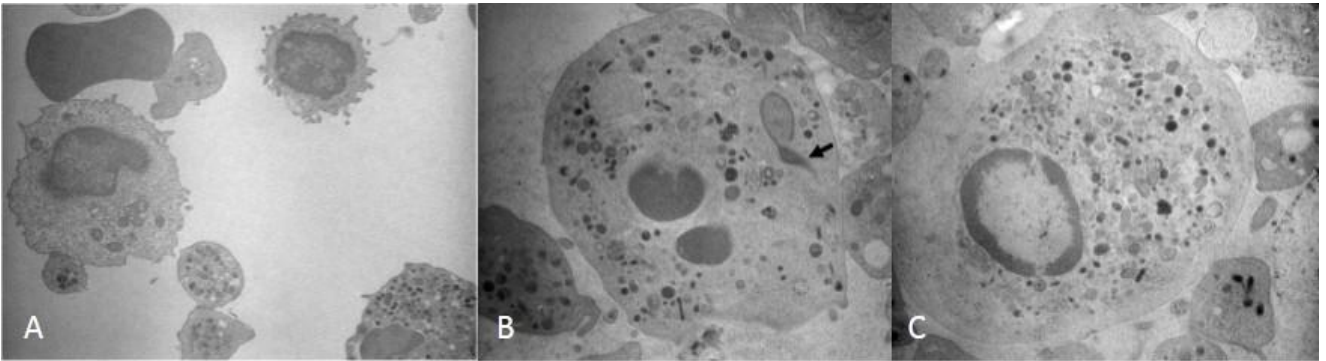
PMN neutrófilos estimulados con OVA en cultivos de leucocitos totales autólogos interactuaron con linfocitos generando lo que denominamos la “*roseta neutrófilo linfocitaria*” (RNLs), constituida por un PMN neutrófilo central y tres o más linfocitos en contacto, luego de 72 hs de cultivo (Figura 38).



**Figura 38. Imagen representativa de MO que muestra una “*roseta neutrófilo linfocitaria*” (RNL) con un PMN neutrófilo central y tres linfocitos en contacto, en el campo se observan además otros linfocitos. Muestra de cultivos de leucocitos totales autólogos después de la estimulación con OVA durante 72 hs. Tinción Azul de Toluidina. 1000x.**

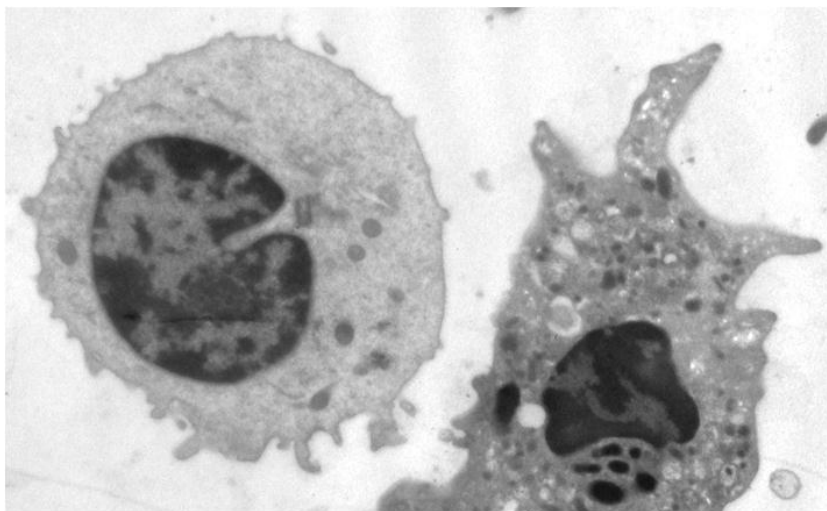
### **Observaciones ultraestructurales**

Algunas muestras de cultivos autólogos fueron sometidas a la técnica para observación con MET. Se observaron las características granulaciones de los PMN neutrófilos y el núcleo polilobulado (Figura 39).

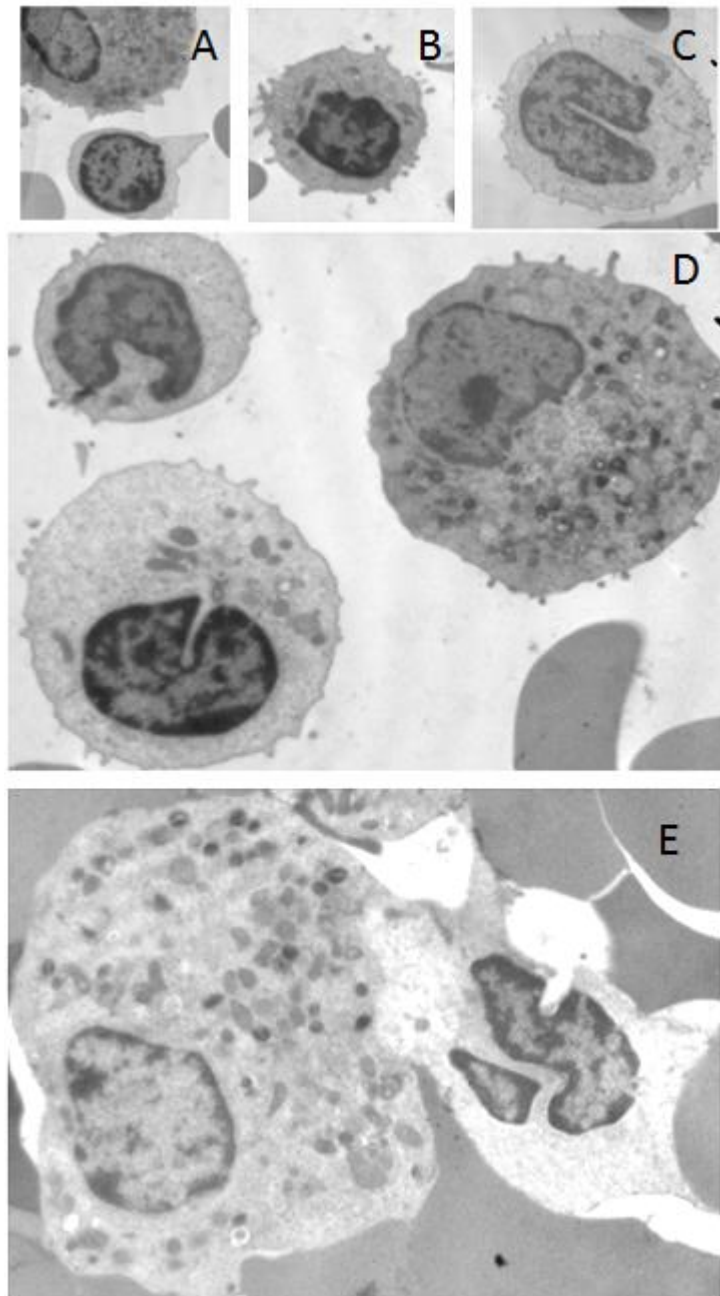


**Figura 39. Imágenes con MET representativas de cultivo autólogo de leucocitos totales. 1 hora de cultivo.** **A.** Imagen que muestra un monocito (izquierda), un linfocito (arriba) y una sección de citoplasma de PMN neutrófilo con sus característicos gránulos (abajo derecha). Se observan algunas plaquetas. 4600x. **B. Ultraestructura de PMN neutrófilo.** Imagen que muestra un PMN neutrófilo con sus característicos gránulos. El corte pasa por tres lóbulos nucleares y parte de un delgado puente cromatínico (flecha). Se observan algunas plaquetas. 7750x. **C. Ultraestructura de PMN neutrófilo.** Imagen que muestra un PMN neutrófilo con sus característicos gránulos, el corte pasa por un solo lóbulo nuclear con heterocromatina periférica. Se observan algunas plaquetas. 7750x.

En algunos linfocitos próximos a PMN neutrófilos, se observó polarización de mitocondrias orientadas hacia el PMN neutrófilo. (Figura 40 y 41).



**Figura 40. Imágen con MET representativa de cultivo autólogo de leucocitos totales.** Porción de citoplasma de un PMN neutrófilo (derecha) y linfocito con mitocondrias orientadas hacia la vecindad con el PMN neutrófilo. 6000x.



**Figura 41. Imágenes con MET representativas de cultivo autólogo de leucocitos totales. A.** Porción de citoplasma de un PMN neutrófilo y linfocito con aspecto de “espejo de mano” (abajo) 7750x. **B.** Linfocito 6000x. **C.** Linfocito. Obsérvese la profunda escotadura en el núcleo redondo. 6000x **D.** PMN neutrófilo (derecha), linfocito con aspecto en reposo (izquierda arriba) y linfocito con aspecto activado (izquierda abajo) con sus mitocondrias orientadas hacia la vecindad con el PMN neutrófilo. Se observan glóbulos rojos. 6000x **E.** Interacción celular de contacto entre PMN neutrófilo y linfocito. Se observan glóbulos rojos. 4600x.

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

El estudio de la expresión y características biológicas de fenotipos inducidos *in vitro* de PMN neutrófilos humanos es el tema central de este trabajo de Tesis. Estas células desempeñan un rol clave en la inmunidad innata frente infecciones especialmente bacterianas y fúngicas, pero en la actualidad los leucocitos PMN neutrófilos por su potencial versatilidad en cuanto a sus funciones, han sido propuestos como células moduladoras de la inmunidad adaptativa, tal como se ha mencionado anteriormente (1,2,176).

Tempranos trabajos han postulado la existencia del *fenotipo PMN neutrófilo como CPA*, estableciendo que expresa las moléculas coestimuladoras B7: CD80 y CD86 y la molécula HLA-DR del CMH II, observándose en sitios de inflamación en enfermedades como la granulomatosis de Wegener (166), la AR (167), la colitis crónica (170), entre otras. La posibilidad de los PMN neutrófilos, de jugar un rol de CPA tendría una importante relevancia en la inmunoregulación y la patogénesis de diversas enfermedades. Se observó por otra parte, en trabajos desarrollados *in vitro* que el compromiso del receptor CD11b de los PMN neutrófilos humanos provoca la expresión en superficie de moléculas requeridas para la presentación de antígenos y la activación de células T. Se describió que la molécula coestimuladora B7 CD80 se encuentra preformada en las vesículas secretoras junto con HLA-DR y la coestimuladora B7 CD86 en vesículas secretoras, gránulos secundarios y azurófilos (163,164).

La existencia de este *fenotipo CPA* de PMN neutrófilo, inspiró el estudio de fenotipos generados en cultivos de leucocitos totales y en PMN neutrófilos purificados, con especial énfasis en lograr la observación de la expresión de moléculas coestimuladoras y el HLA DR (CMH II). Se generó así *in vitro* el fenotipo "*PMN neutrófilo-CPA*": tanto en cultivos de leucocitos totales autólogos estimulados *in vitro* con LPS, fMLP u OVA como en cultivos de PMN neutrófilos purificados y se observaron expresando las moléculas coestimuladoras B7: CD80, CD86 y el CMH Clase II (HLA-DR), marcadoras del fenotipo CPA. Recientemente se ha publicado un trabajo con PMN neutrófilos humanos donde se describe la adquisición de la capacidad de presentación de antígenos a las células T CD4 de memoria, al expresar HLA-DR (CMH II) y las moléculas coestimuladoras B7 (177). En dicha publicación se aclara que los estímulos innatos sólo lograron la expresión de moléculas coestimuladoras y no provocaron la expresión del CMH II en contraste con nuestros resultados. Sólo lograron expresión de HLA-DR (CMH II) con el requerimiento del antígeno específico y las células T CD4 de memoria específicas (177).

Por otra parte, a través de los ensayos realizados se generó *in vitro* el fenotipo “PMN neutrófilo-CD4-CD45RO” estimulando con LPS, fMLP y OVA. Es escasa la bibliografía actual sobre la expresión de estas moléculas CD4 y CD45RO en PMN neutrófilos. Se ha observado llamativamente que los PMN neutrófilos de sangre periférica pueden expresar no convencionalmente la molécula CD4 en forma superficial o citoplasmática, en pacientes sanos y en pacientes HIV positivos (32). Como se sabe, CD4 es el co-receptor de células T colaboradoras y el receptor primario para el virus del HIV (32). Según nuestros resultados se observó mayor expresión de CD4 en las muestras de cultivos de PMN neutrófilos estimulados con fMLP. La importancia médica de estos hallazgos radica en la posibilidad de influenciar en la biodistribución del HIV (32).

Por otra lado la molécula CD45-RO, característico marcador de células T de memoria y efectoras, es una tirosin fosfatasa que regula la activación linfocitaria (33), se expresa también en PMN neutrófilos de personas sanas pero no se ha encontrado su ligando natural (34). Además, se ha reportado que esta molécula se expresa en PMN neutrófilos de pacientes con diálisis y PMN neutrófilos activados *in vitro* con fMLP (33), sin embargo, nuestros resultados con estimulación con fMLP mostraron una menor expresión con respecto a otros estimuladores tales como LPS y OVA (no clásico). CD45RO se encontraría en los gránulos específicos de los PMN neutrófilos y es posible que la actividad fosfatasa de esta molécula esté involucrada en la adhesión de los PMN neutrófilos durante la activación (33).

En el fenotipo *PMN neutrófilo CD4, CD45-RO* obtenido en este trabajo de Tesis se observaron moléculas CD4 y CD45-RO en las NETs liberadas luego de la estimulación con LPS o con fMLP durante 30 minutos en cultivos de PMN neutrófilos purificados. Además, en otras situaciones experimentales en co-cultivos autólogos de PMN neutrófilos purificados estimulados con LPS y leucocitos MN purificados estimulados con OVA, se observó la ocurrencia de NETs con moléculas CD4 y CD45-RO co-localizadas en las mismas. Interesantemente se ha reportado la presencia de CD4 en forma soluble (sCD4) y se postuló que inhibiría la entrada del HIV a las células (178).

Con respecto al tiempo de vida *in vitro* de los PMN neutrófilos, en cultivos controles los PMN neutrófilos se observaron viables hasta 30 min, en coincidencia con la bibliografía (44). Cuando estas células son estimuladas *in vitro* con activadores clásicos y no clásico el tiempo de vida *in vitro* se prolongó, de modo que en cultivos de PMN neutrófilos purificados estimulados con LPS se observaron células viables hasta 48 hs de cultivo, en cambio estimulados con OVA



se observaron viables hasta 60 hs de cultivo, expresando las moléculas del fenotipo CPA en ambos casos. Bajo estímulos proinflamatorios se vió afectada la vida en cultivo de estas células. Esto recuerda lo descrito en el estudio *in vitro* realizado en nuestro laboratorio con leucocitos de pacientes con serología positiva para Enfermedad Chagas (45). No todos los estímulos de activación tienen la misma consecuencia, en nuestros ensayos los PMN neutrófilos estimulados con fMLP se observaron viables sólo hasta 30 minutos, al igual que lo descrito por Sandilands *et al.* (164) quienes reportaron que los estímulos con LPS fueron más efectivos en la activación que los estímulos con fMLP.

En cuanto al tiempo de vida en el caso del *fenotipo PMN neutrófilo CD4, CD45-RO* se observaron viables hasta 30 min de cultivo con todos los estimuladores.

Los fenotipos de PMN neutrófilos generados *in vitro* liberaron NETs. El mecanismo de formación de NETs implica que las membranas nucleares y los gránulos se desintegren. Los componentes del núcleo se mezclan con el citoplasma, la membrana plasmática se rompe y se expulsa el interior de la célula al espacio extracelular, formando NETs (179). Se observó en muestras apareadas controles sin estimulación la formación de NETs en 5 % de las células, en coincidencia con lo descrito en bibliografía (110), en estos casos, la generación de las NETs puede haberse debido a la activación espontánea de los neutrófilos debido a su manipulación, a las variaciones de temperatura o a su interacción con plaquetas por ejemplo.

En la bibliografía está descrito que las moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) pueden encontrarse preformadas en los gránulos citoplásmicos de los PMN neutrófilos. Los autores Sandilands *et al.* describen estos reservorios citoplasmáticos de moléculas B7: CD80 principalmente dentro de vesículas secretoras y CD86 dentro de gránulos azurófilos, secundarios y vesículas secretoras (164). Recordemos que las NETs son estructuras compuestas con elementos granulares, nucleares y citoplásmicos, es factible entonces que si las moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86 están en los gránulos de PMN neutrófilos, ¿puedan ser parte de las NETs? Postulamos en este trabajo de Tesis que como los componentes granulares son parte de las NETs, entonces también se pueden encontrar moléculas coestimuladoras formando parte de ellas. Observamos dichas moléculas coestimuladoras B7 presentes dentro de las células en muestras de controles no estimulados: a los 30 minutos la molécula B7 CD86 fue positiva, a los 120 minutos B7 CD86 y B7 CD80 fueron positivas pero a las 24 horas ambas fueron negativas. A los 30 minutos, se encontró B7 CD86 teñido en algunas

células en la superficie celular. A los 120 minutos se encontró B7 CD86 en el citoplasma en muestras de sangre apareadas no estimuladas de los controles, como así también B7 CD80. En concordancia con otros autores, las muestras permeabilizadas mostraron tinción dentro de las células en reservorios citoplasmáticos de moléculas B7 CD80 y CD86 (164). Estos hallazgos son consistentes con el patrón de expresión temporal de las moléculas B7 CD80 y CD86. Se ha establecido que el compromiso del receptor Mac 1 (CD11b + CD18) da como resultado la translocación de moléculas B7 CD80, CD86 y HLA-DR (CMH II) en la superficie de los PMN neutrófilos de sangre periférica humana normal. Esto representa una forma de activación de los PMN neutrófilos. Se han documentado muchos activadores de los PMN neutrófilos (49), entre estos activadores, el LPS es uno de los más reconocidos. El LPS estimula la liberación de vesículas secretoras (164) y la liberación de NETs (74). En el presente trabajo de Tesis, las NETs liberadas se confirmaron mediante tinción de inmunofluorescencia de ADN con DAPI y un marcador específico de NETosis como la EN. Las NETs se visualizaron como tinción azul difusa de DAPI (ADN) o distribución de cromatina en numerosas fibrillas, o aspecto de "pulverización" en todas las pruebas de estimulación con LPS u OVA. En el ensayo de LPS a los 30 minutos, la tinción de inmunofluorescencia mostró una apariencia granular de EN y además se encontró B7 CD86 en algunas células. A los 30 min la EN se localiza dentro de los gránulos azurófilos. Papayannopoulos *et al.* postulan que la EN se localiza en el núcleo 60 minutos después de la estimulación, acompañado de tinción granular reducida (71). La EN migra de los gránulos azurófilos al núcleo y degrada parcialmente las histonas que promueven la descondensación de la cromatina en el proceso de formación de NETs. Nosotros mostramos resultados con EN a los 120 min y la EN co-localizada con cromatina en concordancia con la bibliografía (68,71).

Se observaron moléculas co-localizadas B7 CD80 y CD86 con anticuerpos específicos en la superficie celular y en las NETs. Este hallazgo fue posible porque después de la activación, los PMN neutrófilos del fenotipo CPA liberan NETs que comprenden cromatina descondensada asociada con proteínas granulares y citosólicas. En las muestras estimuladas se detectaron moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86 en la superficie celular y se co-localizaron en NETs a los 30 minutos, 120 minutos y 24 horas. Los resultados en las muestras de sangre apareadas no estimuladas de controles a los 30 minutos mostraron que B7 CD80 era negativo y B7 CD86 se detectó en algunas células que pueden ser monocitos, de acuerdo con Smyth *et al.* (151). En el ensayo de LPS a los 120 minutos, se encontraron CD86 y CD80 en muestras de control.

En este trabajo con PMN neutrófilos humanos utilizamos OVA como activador no clásico inductor de NETs y como antígeno heterólogo. En experimentos murinos realizados por otros investigadores se observó la presencia de antígeno portado por neutrófilos en órganos linfoides de ratones inmunizados con OVA (180). Aunque se ha aceptado generalmente que los neutrófilos no están implicados en las respuestas adaptativas, se observó la captación de antígeno OVA por neutrófilos en esos experimentos. Estos neutrófilos secretan principalmente TNF alfa y los autores concluyen que esto les permitiría participar como células inmunomoduladoras (180). Las NETs pueden inducirse por inmunocomplejos OVA: anti-OVA (110) y en otros granulocitos, se describió la formación de trampas extracelulares (ETs) inducidas por OVA (181). En nuestro trabajo observamos la generación de NETs después de la estimulación con LPS u OVA en diferentes momentos, pero en el ensayo de OVA observamos menos células con moléculas B7 CD80 y CD86 en las NETs ( $p < 0,001$ ) con respecto a las formadas con estímulo de LPS. Los resultados de los ensayos con OVA probablemente se corresponderían a la estimulación por OVA sola o bien, por estimulación con complejos inmunes OVA-anti OVA, debido a la posible existencia de anticuerpos anti-OVA específicos en el suero de los donantes. Los controles no estimulados con LPS u OVA mostraron poca o ninguna expresión de moléculas B7 CD80 y CD86.

En algunos experimentos realizados en este trabajo de Tesis utilizamos sangre entera para cultivos de leucocitos totales en vez de cultivos de PMN neutrófilos purificados, para evitar la activación espontánea de PMN neutrófilos (164). Habiendo usado leucocitos totales, había posibilidades de que otros granulocitos también produzcan ETs (182–187), pero en dichos experimentos, podemos atribuir la generación de ET a los PMN neutrófilos porque usamos la EN como un marcador específico de NETs (73). Las NETs tienen una "composición única: cromatina estrechamente ligada a proteínas de neutrófilos como EN, MPO o calgranulina, y esta definición excluye la cromatina liberada por otras formas de muerte celular" (67).

Como es bien sabido, los PMN neutrófilos tienen una vida corta; sin embargo, bajo ciertas condiciones de estimulación pueden vivir más tiempo. Después de 24 horas de cultivo observamos la liberación de NETs, con presencia de las moléculas B7 CD80 y CD86 en las mismas. La importancia del hallazgo de la presencia de moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86 reside en las funciones que pueden adquirir los PMN neutrófilos, entre ellas, la posibilidad de adquirir competencia para ser CPA y jugar un papel en la inmunomodulación. También la presencia de moléculas B7 CD80 y CD86 en las NETs les permitiría influir en el

entorno celular, en la activación de la vía B7-1 / B7-2: CD28 / CTLA-4 lo que puede provocar la estimulación o la inhibición de otras células, como las células T activadas o las Treg. Este hallazgo podría tener relevancia en la ruptura de la tolerancia inmune periférica mediada por las NETs ya que, como se comentó anteriormente, la presencia de moléculas coestimuladoras B7 puede proveer la segunda señal para la activación de las células T autoreactivas.

Las moléculas B7 CD80 y CD86 tienen características de una llave que abre diferentes puertas, en relación al receptor CD28 o CTLA-4, por lo tanto los efectos serán diferentes, opuestos y las respuestas pueden ser estimulantes, inhibitoras o anérgicas, considerando la complejidad de diversas poblaciones de células T, vírgenes y efectoras. En consecuencia, los PMN neutrófilos pueden modular la respuesta inmune cambiando los fenotipos y ejercer así funciones para interactuar con otras células inmunes que resultan en perfiles proinflamatorios o anti-inflamatorios (1). De esta manera los neutrófilos demuestran que son células versátiles, capaces de modular la respuesta inmune adaptativa, y no limitar simplemente su papel a la fagocitosis.

Por otro lado, se realizó un experimento con células T para evaluar la posible relevancia funcional de las moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86 co-localizadas en las NETs. Dicho ensayo consistió en la generación de sinapsis inmunes en RMLs. Las RMLs implican un fenómeno de procesamiento y presentación de antígenos, que involucran a un macrófago central rodeado por linfocitos (147). Se ha descrito que los linfocitos que forman las rosetas RMLs son células T-CD4 (147). En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se demostró que la adición de antígenos heterólogos en cultivos de células mononucleares purificadas estimuló la formación de RMLs (147). En este trabajo de Tesis, se realizó un ensayo de RMLs con la adición de OVA (antígeno heterólogo) en cultivos de leucocitos autólogos totales y se observó la formación de un número mayor de RMLs. En las mismas muestras encontramos por IF moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86 co-localizadas en NETs. Los experimentos controles fueron cultivos de leucocitos de los mismos donantes sin el agregado de OVA. En trabajos anteriores realizados por Cabral y Novak, se hipotetizó que la presencia de PMN neutrófilos autólogos o de los materiales derivados de ellos durante el cultivo, podría proporcionar un microambiente que mejora la formación de RMLs porque el mayor número de RMLs ocurrió en las muestras de leucocitos totales, mientras que sólo unas pocas aparecieron en las muestras de células mononucleares (147). Aquí la OVA fue el antígeno heterólogo procesado y presentado además de los propios antígenos derivados de PMN neutrófilos

senescentes considerando la muerte natural (espontánea) de PMN neutrófilos en este tiempo de cultivo. En este estudio, la presencia de moléculas coestimuladoras en las NETs no es un requisito para la aparición de RMLs, pero sería relevante en la presencia del mayor número de RMLs porque el procesamiento y la presentación del antígeno están implicados en el fenómeno RMLs como demostraron Novak y Cabral experimentalmente en trabajos anteriores (148). Las moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86 presentes en las NETs pueden ser responsables en parte de modular la respuesta T en RMLs, pero el incremento en RMLs después del estímulo OVA puede ser una consecuencia de monocitos-macrófagos centrales que expresan moléculas coestimuladoras contra estímulos heterólogos además de la presencia de NETs o PMN neutrófilos netóticos. Este hallazgo podría tener relevancia para una ruptura de la tolerancia inmune mediada por las NETs. Esta posibilidad requiere elucidación por trabajos posteriores para demostrar el impacto de las NETs en las funciones de las células T.

El efecto del inhibidor de procesamiento y presentación de antígenos vía Clase II *cloroquina* sobre SI en RML resultó en la no formación de rosetas, tal como se esperaba en coincidencia con la bibliografía (148) ya que el fenómeno RML representa procesamiento y presentación antigénica que fue bloqueada por el inhibidor. Sin embargo, el efecto de *cloroquina* sobre la expresión de las moléculas marcadoras del *fenotipo PMN neutrófilo CPA* resultó en similar expresión de moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86). Esto se relaciona con la estimulación y señalización necesarias para la expresión de dichas moléculas en la superficie celular. Las moléculas B7 (CD80 y CD86) se producen en respuesta a la señalización de LPS a través del compromiso de TLR4 (31). Se ha observado que receptores innatos como TLR2 y TLR4 regulan la expresión de moléculas B7-1 (CD80) (188). Es sabido, que TLR4 tiene como ligando al LPS, clásico activador de PMN neutrófilos, pero en esta situación experimental se utilizó al activador no clásico OVA como estimulador y como antígeno heterólogo ya fundamentado.

El estudio del *fenotipo "PMN neutrófilo-CPA"* consideró la posibilidad de interacciones de contacto celular, que podrían dar lugar a una "SI" para la posible presentación antigénica. Se observaron interacciones celulares de contacto entre PMN neutrófilos y linfocitos en cultivos de leucocitos totales autólogos a través de MO y MET. PMN neutrófilos estimulados con OVA en cultivos de leucocitos totales autólogos interactuaron con linfocitos generando lo que denominamos la "*roseta neutrófilo linfocitaria*" (RNLs), constituida por un PMN central y tres o más linfocitos en contacto, luego de 72 hs de cultivo. Este hallazgo preliminar merece un

estudio ulterior acerca de su significado biológico. Es de destacar sin embargo, que con MET las membranas plasmáticas de las células en interacción se observaron en cerrado contacto y en linfocitos se observó la distribución de mitocondrias en la zonas vecinas de contacto con PMNs. Se recuerda que la activación de células T requiere translocación mitocondrial hacia la “SI” (145) y la posición de las mitocondrias controla el influjo de Calcio hacia la “SI” en las células T (143,144). Las mitocondrias son consideradas actualmente con funciones reguladoras de la inmunidad innata y adaptativa y son determinantes en los fenotipos que adoptan las células inmunes en sus respuestas.

En síntesis, los neutrófilos PMN son leucocitos que no sólo limitan su función a la fagocitosis, producción de ROS y generación de NETs, sino también modulan la respuesta inmune de acuerdo con el microambiente donde están y según la interacción que establecen con otros tipos de células. Los PMN neutrófilos tienen un papel en la activación y regulación de la inmunidad innata y adaptativa (2). La variabilidad de sus funciones según su entorno, fisiológico o condición patológica, y la expresión de diferentes marcadores de superficie han permitido caracterizar diferentes perfiles de neutrófilos en modelos murinos y humanos (189). Los PMN neutrófilos son células muy interesantes implicadas en inmunidad innata y adaptativa. Hay muchos fenotipos descriptos de PMN neutrófilos (172,189–191), pero hay descripciones heterogéneas en la literatura, porque los parámetros, métodos, especies, tejidos, moléculas biomarcadoras, son diferentes. De todos modos, estos estudios son muy útiles en el contexto desarrollado evitando la extrapolación.

Con respecto al fenotipo de “PMN neutrófilo-CPA”, se destaca que la presencia de moléculas coestimuladoras en las NETs les permitiría influir en el entorno celular (192). Se enfatiza nuevamente que este hallazgo podría tener relevancia para una ruptura en la tolerancia inmune mediada por las NETs. Diferentes acciones inmunomoduladoras podrían ser desencadenadas por la activación de la vía B7-1 (CD80) / B7-2 (CD86) -CD28 / CTLA-4 lo que resulta en estimulación, inhibición o anergia de diferentes poblaciones de linfocitos T, vírgenes, efectores, de memoria y reguladores. Del mismo modo, las diferentes interacciones celulares y las citoquinas secretadas también pueden tener una influencia en la generación de diferentes perfiles de neutrófilos proinflamatorios o anti-inflamatorios. De esta manera, la posibilidad de adquirir competencia para ser CPAs por los PMN neutrófilos con moléculas coestimuladoras en las NETs podrían vincular las respuestas innatas y adaptativas.

Con respecto al *fenotipo de "PMN neutrófilo CD4-CD45RO"*: se destaca la expresión de la molécula CD4 co-receptor de células T colaboradoras y receptor primario para el virus del HIV (32). Se han descrito formas solubles de CD4 con elevados niveles en algunas enfermedades y en pacientes con HIV (178,193), las mismas pueden inhibir la infección viral aunque el modo es desconocido al momento. La importancia de este hallazgo radica en la posibilidad de influenciar en la distribución del HIV. La presencia de la molécula CD45RO, característico marcador de células T de memoria y efectoras, tirosin fosfatasa que regula la activación linfocitaria podría estar involucrada en la adhesión de los PMN neutrófilos durante la activación según Pulido *et al* (33). Estos hallazgos preliminares de expresión de moléculas no convencionales dan lugar a la exploración del significado funcional en ulteriores estudios.

Los diferentes fenotipos de PMN neutrófilos podrían jugar un papel importante en la inmunomodulación.

Los hallazgos de este trabajo de Tesis con respecto a la expresión de moléculas características de las CPA profesionales en PMN neutrófilos, permite definirlo como potencial CPA.

Entre los resultados obtenidos, la presencia de moléculas coestimuladoras B7 en las NETs resulta interesante porque permitiría explicar la fisiopatología de enfermedades donde estas moléculas podrían estar implicadas. Debe recordarse, la existencia de formas solubles de moléculas coestimuladoras B7, que son funcionalmente idénticas a sus pares de membrana, con lo que se podría explicar que las moléculas B7 liberadas por las NETs también puedan ejercer sus funciones de coestimulación. El fenómeno denominado *trogocitosis*, mencionado anteriormente, consistente en la transferencia de fragmentos de membrana o moléculas de superficie de una célula a otra conservando su capacidad funcional, también podría suceder si las moléculas son liberadas por las NETs. Es decir, las moléculas B7 CD80 y CD86 liberadas por las NETs podrían cumplir su rol de coestimulación, e influenciar para que en otras células se desencadene la completa activación, inhibición o anergia. Esto podría suceder por ejemplo en enfermedades autoinmunes como AR, enfermedad de Sjögren, LES, entre otras, donde se describe a la ocurrencia de NETs como mecanismo fisiopatológico (94,194,195).

Por otro lado, en el fenotipo CD4-CD45RO de PMN neutrófilos el hallazgo de CD4 en NETs, como se dijo, podría influir en la biodistribución del HIV siendo el receptor primario de este virus. La presencia de CD45RO, contribuiría a potenciar la adhesión en PMN neutrófilos. No se

conoce el significado funcional de la expresión estas moléculas no convencionales en estas células.

En suma, los resultados recabados son importantes, ya que pueden ser tenidos en cuenta como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades donde las moléculas expresadas por los fenotipos pueden cumplir un papel relevante al influir en el microambiente celular donde se encuentren. Sería de gran interés investigaciones futuras sobre el impacto de las NETs que expresan las moléculas de los fenotipos estudiados, en el rol de las células T u otros tipos celulares inmunes.



## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

### **Estudio de la expresión y características biológicas de fenotipos inducidos *in vitro* de neutrófilos humanos:**

En general, teniendo en cuenta la hipótesis y los objetivos de este trabajo de Tesis, los principales aportes se corresponden con la generación de dos fenotipos de PMN neutrófilos *in vitro*. Se destaca el fenotipo PMN neutrófilo-CPA que puede liberar NETs que contienen moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) y MHC II (HLA-DR) lo que permitiría influenciar el microambiente donde las mismas son liberadas, comprometiendo la vía B7-1 (CD80) / B7-2 (CD86): CD28 – CTLA 4 en las diferentes subpoblaciones de células T. Este hecho contribuiría a explicar la fisiopatología de enfermedades donde las NETs están implicadas y con ello constituir eventuales nuevos blancos terapéuticos. Por otra parte, el hallazgo de la expresión de moléculas no convencionales del fenotipo PMN neutrófilo-CD4, CD45RO y la liberación de NETs conteniendo dichas moléculas, pueden sentar las bases de futuras investigaciones donde se evalúe su significado funcional.

A continuación, sintetizamos las principales conclusiones:

- Se generaron diferentes Fenotipos de PMN neutrófilos *in vitro*, con y sin el uso de activadores clásicos y uno no clásico:
  - Fenotipo PMN neutrófilo-CPA
  - Fenotipo PMN neutrófilo CD4, CD45RO
  - El Fenotipo PMN neutrófilo control, surge de las muestras apareadas sin estimulación
- **El Fenotipo PMN neutrófilo control:**
  - No expresa las moléculas coestimuladoras B7 (CD80 y CD86) y CMH II (HLA-DR).
  - Expresa en algún grado las moléculas no convencionales CD4 y CD45RO.
  - Puede generar NETs (5%).
- **El Fenotipo PMN neutrófilo-CPA:**
  - Expresa las moléculas CD80, CD86 y HLA-DR, en coincidencia con trabajos realizados por otros autores, lo que posiciona al PMN neutrófilo como potencial CPA.
  - Es capaz de generar NETs con activadores clásicos (LPS: 23% y fMLP: 20%) y no clásico (OVA: 18%).

- Expresa las moléculas B7 (CD80, CD86) y MHC II (HLA-DR) en las NETs, hallazgo descripto por nuestro equipo de investigación.
- Incrementa la ocurrencia de sinapsis inmunológicas en el modelo de RMLs, en la presencia de NETs que contienen las moléculas coestimuladoras B7 CD80 y CD86, generadas por estimulación con OVA.
- Presenta variaciones en el tiempo de vida *in vitro* según los diferentes activadores: en los cultivos estimulados con LPS se observaron células viables hasta 48 hs de cultivo, con OVA hasta 60 hs de cultivo, expresando las moléculas del fenotipo CPA en ambos casos. En los PMN neutrófilos estimulados con fMLP se observaron viables hasta 30 min.
- **El Fenotipo PMN neutrófilo-CD4, CD45RO:**
  - Expresa las moléculas CD4 y CD45RO.
  - Presenta una vida media de 30 minutos con los activadores LPS, fMLP y OVA.
  - Es capaz de generar NETs con activadores clásicos y uno no clásico.
  - Las NETs liberadas pueden contener moléculas CD4 y CD45RO.
- Se observaron **interacciones celulares de contacto** entre PMN neutrófilos y linfocitos en cultivos de leucocitos totales autólogos a través de MO y MET.
- PMN neutrófilos estimulados con OVA en cultivos de leucocitos totales autólogos interactuaron con linfocitos generando lo que denominamos la “**roseta neutrófilo linfocitaria**” (**RNLs**), constituida por un PMN central y tres o más linfocitos en contacto, luego de 72 hs de cultivo.

Consideramos que nuestro trabajo científico aportó nuevos datos sobre las importantes funciones inmunológicas que llevan a cabo las células implicadas. La posibilidad de que los PMN neutrófilos, en determinadas condiciones, tengan un rol de CPA tendría gran relevancia en la inmunoregulación y la patogénesis de diversas enfermedades.

Los PMN neutrófilos tendrían una función importante en los mecanismos efectores y reguladores de las respuestas innatas y adaptativas según recientes evidencias. La variabilidad de sus funciones de acuerdo a su entorno en condiciones fisiológicas o patológicas y la expresión diferencial de moléculas de superficie han permitido caracterizar diferentes perfiles fenotípicos (189).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este estudio de la expresión y características biológicas de fenotipos inducidos in vitro de neutrófilos humanos desarrollado en esta investigación, los hallazgos observados podrían ser el punto de partida para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades donde los PMN neutrófilos, las NETs y las diferentes subpoblaciones de los linfocitos T son fisiopatológicamente responsables.

## **PERSPECTIVAS**

A partir de las observaciones realizadas en este trabajo de Tesis, surgen nuevos interrogantes que permiten plantear nuevos objetivos para ulteriores trabajos de investigación:

Estudiar las interacciones de los fenotipos generados in vitro con otros tipos celulares inmunes, observando activación y proliferación de linfocitos TCD4.

Observar la influencia de las moléculas coestimuladoras liberadas en las NETs con respecto a la activación y proliferación de linfocitos TCD4.

Evaluar la relevancia funcional de las moléculas CD4 y CD45RO en PMN neutrófilos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Perobelli SM, Galvani RG, Gonçalves-Silva T, Xavier CR, Nóbrega A, Bonomo A. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Brazilian J Med Biol Res*; 48(8): 665–75. 2015.
2. Mantovani A, Cassatella M, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 11(8): 519–31. 2011.
3. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*; 17(11): 1381–90. 2011.
4. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*; 49(9): 1618–31. 2010.
5. Zhang F, Liu AL, Gao S, Ma S, Guo S Bin. Neutrophil dysfunction in sepsis. *Chin Med J (Engl)*; 129(22): 2741–4. 2016.
6. Carvalho LO, Aquino EN, Neves ACD, Fontes W. The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. *J Cell Biochem*; 116(9): 1831–6. 2015.
7. Olins DE, Olins AL. Granulocyte heterochromatin: Defining the epigenome. *BMC Cell Biol*; 6: 1–14. 2005.
8. Hoffmann K, Sperling K, Olins AL, Olins DE. The granulocyte nucleus and lamin B receptor: Avoiding the ovoid. *Chromosoma*; 116(3): 227–35. 2007.
9. Cabral H. Neutrophils with ring-shaped nuclei in human Chagas' disease. *Br J Haematol*; 67: 118–9. 1987.
10. Cabral HRA, Robert GB. Ring shaped nuclei in human neutrophilic leukocytes of healthy individuals: evidence of their occurrence and characteristics. *Am J Hematol*; 30: 259–60. 1989.
11. Kanoh T. Ring neutrophils in plasma cell dyscrasia. *Arch Pathol Lab Med*; 115(2): 178–80. 1991.
12. Kanoh T, Saigo K, Yamagishi M. Neutrophils with ring-shaped nuclei in chronic neutrophilic leukemia. *Am J Clin Pathol*; 86(6): 748–51. 1986.
13. Schmitz LL, McClure JS, Litz CE, Dayton V, Weisdorf DJ, Parkin JL, et al. Morphologic and quantitative changes in blood and marrow cells following growth factor therapy. *Am J Clin Pathol*; 101(1): 67–75. 1994.
14. Peichev M. Ring cells in infectious mononucleosis. *Br. J. Haematol.* 62(2): 397–8. 1986.
15. Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *Hematol Cell Ther*; 38(5): 363–80. 1996.

16. Ruutu P. Granulocyte function in myelodysplastic syndromes. *Scand J Haematol Suppl*; 45: 66–70. 1986.
17. Kouides PA, Bennett JM. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. *Semin Hematol*; 33(2): 95–110. 1996.
18. Lemez P, Kacirkova P. Variations of hairy cell nuclei shapes with regard to ring-shaped nuclei simulating dysplastic neutrophilic granulocytes and review of the literature. *Int J Lab Hematol*; 36(5): 580–6. 2014.
19. Diz Dios P, Ocampo Hermida A, Fernandez Feijoo J. Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos. *Med Oral*; 7(1): 206–21. 2002.
20. Gallin JI. Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood*; 63(5): 977–83. 1984.
21. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev*; 273(1): 48–60. 2016.
22. Beyrau M, Bodkin J V, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *OpenBiol*; 2(2046-2441 (Electronic)): 120134. 2012.
23. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*; 273: 11–28. 2016.
24. Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol*; 5: 1–12. 2014.
25. Borregaard N, Kjeldsen L, Rygaard K, Bastholm L, Nielsen MH, Sengelev H, et al. Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest*; 90: 86–96. 1992.
26. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*; 17(3): 638–50. 2013.
27. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res*; 342(2): 200–9. 2016.
28. Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, Karlsson A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol*; 163(10): 5592–8. 1999.
29. Makoni M, Eckert J, Anne Pereira H, Nizet V, Lawrence SM. Alterations in neonatal neutrophil function attributable to increased immature forms. *Early Hum Dev*; 103: 1–7.

2016.

30. Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*; 108(7): 2455–62. 2006.
31. Murphy K, Weaver C. Janeway. 9<sup>o</sup> ed. New York, USA. Taylor and Francis Group. 1-927. 2017.
32. Biswas P, Mantelli B, Sica A, Malnati M, Panzeri C, Saccani A, et al. Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. *Blood*; 101(11): 4452–6. 2003.
33. Pulido R, Alvarez V, Mollinedo F, Sánchez-Madrid F. Biochemical and functional characterization of the leucocyte tyrosine phosphatase CD45 (CD45RO, 180 kD) from human neutrophils. In vivo upregulation of CD45RO plasma membrane expression on patients undergoing haemodialysis. *Clin Exp Immunol*; 87(2): 329–35. 1992.
34. Yu CL, Yu HS, Sun KH, Hsieh SC, Tsai CY. Anti-CD45 isoform antibodies enhance phagocytosis and gene expression of IL-8 and TNF- $\alpha$  in human neutrophils by differential suppression on protein tyrosine phosphorylation and p56lck tyrosine kinase. *Clin Exp Immunol*; 129(1): 78–85. 2002.
35. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Front Immunol*; 5: 1–7. 2014.
36. Palomino DCT, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein*; 13(3): 469–73. 2015.
37. Tecchio C, Cassatella MA. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol*; 28(2): 119–28. 2016.
38. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe*; 15(5): 526–36. 2014.
39. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog*; 11(3): 1–22. 2015.
40. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*; 33(5): 657–70. 2010.
41. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*; 9: 181–218. 2014.
42. Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol*; 37(5): 334–45. 2016.
43. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L.



- Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*; 80(5): 617–53. 2000.
44. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*; 13(3): 159–75. 2013.
  45. Rodriguez FM, Orquera AD, Maturano MR, Infante NS, Carabajal-Miotti C, Gonzalez-Silva N, et al. Human Neutrophils in Patients with Positive Serology for Chagas Disease. *J Immunol Infect Dis*; 3(1): 1–8. 2016.
  46. Teng TS, Ji AL, Ji XY, Li YZ. Neutrophils and immunity: From bactericidal action to being conquered. *J. Immunol. Res.* 2017: 1–14. 2017.
  47. Geering B, Simon H-U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ*; 18(9): 1457–69. 2011.
  48. Miralda I, Uriarte SM, McLeish KR. Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Front Cell Infect Microbiol*; 7: 1–13. 2017.
  49. Vogt KL, Summers C, Chilvers ER, Condliffe AM. Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo. *Eur J Clin Invest.* 48: 1–9. 2018.
  50. Ekpenyong AE, Toepfner N, Chilvers ER, Guck J. Mechanotransduction in neutrophil activation and deactivation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*; 1853(11): 3105–16. 2015.
  51. Swain SD, Rohn TT, Quinn MT. Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents. *Antioxid Redox Signal*; 4(1): 69–83. 2002.
  52. Yao Y, Matsushima H, Ohtolo JA, Geng S, Lu R, Takashima A. Neutrophil priming occurs in a sequential manner and can be visualized in living animals by monitoring IL-1 $\beta$  promoter activation. *J Immunol*; 194(3): 1211–24. 2015.
  53. van der Linden M, Meyaard L. Fine-Tuning Neutrophil Activation: Strategies and Consequences. *Immunol Lett*; 178: 3–9. 2016.
  54. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*; 85(1): 765–92. 2016.
  55. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol*; 30(1): 459–89. 2012.
  56. Futosi K, Mócsai A. Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunol Rev*; 273(1): 121–39. 2016.
  57. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.* 35(4): 377–94. 2013.

58. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*; 15(7): 602–11. 2014.
59. Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell Tissue Res*. 371(3): 455–71. 2018.
60. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev*; 82(1): 1–22. 2018.
61. Uriarte SM, Powell DW, Luerman GC, Merchant ML, Cummins TD, Neelakshi R, et al. Membranes and Plasma Membranes of Human Neutrophils. *J Immunol*; 180: 5575–81. 2008.
62. Hidalgo MA, Carretta MD, Teuber SE, Zárate C, Cárcamo L, Concha II, et al. fMLP-Induced IL-8 release is dependent on NADPH oxidase in human neutrophils. *J Immunol Res*; 2015: 1–14. 2015.
63. Borregaard N. What doesn't kill you makes you stronger: The anti-inflammatory effect of neutrophil respiratory burst. *Immunity*; 40(1): 1–2. 2014.
64. Filip-Ciubotaru F, Manciu C, Stoleriu G, Foia L. NADPH Oxidase : Structure and Activation Mechanisms (Review). *Note I. Rev Med Chir Soc Med Nat*; 120(1): 29–33. 2016.
65. Fainboim L, Geffner J. *Introducción a la inmunología humana*. 6º ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A. 1-563. 2011.
66. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*; 303(5663): 1532–5. 2004.
67. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*; 198(5): 773–83. 2012.
68. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*; 176(2): 231–41. 2007.
69. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*; 16(11): 1438–44. 2009.
70. Keshari RS, Jyoti A, Kumar S, Dubey M, Verma A, Srinag BS, et al. Neutrophil extracellular traps contain mitochondrial as well as nuclear DNA and exhibit inflammatory potential. *Cytom Part A*; 81 A(3): 238–47. 2012.
71. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*; 191(3): 677–91. 2010.
72. Halverson TWR, Wilton M, Poon KKH, Petri B, Lewenza S. DNA Is an Antimicrobial

- Component of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathog*; 11(1): 1–23. 2015.
73. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*; 459: 89–93. 2016.
  74. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*; 35(4): 513–30. 2013.
  75. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun*; 10(5–6): 414–21. 2018.
  76. Dabrowska D, Jablonska E, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Iwaniuk A. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand J Immunol*; 84(6): 317–22. 2016.
  77. Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, Abraham TE, Van Cappellen WA, Houtsmuller AB, et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS One*; 12(5): 1–29. 2017.
  78. Hamaguchi S, Seki M, Yamamoto N, Hirose T, Matsumoto N, Irisawa T, et al. Case of invasive nontypable *Haemophilus influenzae* respiratory tract infection with a large quantity of neutrophil extracellular traps in sputum. *J Inflamm Res*; 5(1): 137–40. 2012.
  79. Urban CF, Nett JE. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Sem Cell Dev Biol*; (doi: 10.1016/j.semcdb.2018.03.020): 1–11. 2018.
  80. Hermosilla C, Caro TM, Silva LMR, Ruiz A, Taubert A. The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitology*; 141: 1–10. 2014.
  81. Agraz-Cibrian JM, Giraldo DM, Mary FM, Urcuqui-Inchima S. Understanding the molecular mechanisms of NETs and their role in antiviral innate immunity. *Virus Res*; 228: 124–33. 2017.
  82. Kim SJ, Jenne CN. Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury. *Semin Immunol*; 28(6): 546–54. 2016.
  83. Palmer LJ, Damgaard C, Holmstrup P, Nielsen CH. Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria. *J Periodont Res*; 51(1): 70–6. 2016.
  84. Chen K, Nishi H, Travers R, Tsuboi N, Martinod K, Wagner DD, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood*; 120(22): 4421–31. 2012.
  85. Behnen M, Leschczyk C, Möller S, Batel T, Klinger M, Solbach W, et al. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil

- granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J Immunol*; 193(4): 1954–65. 2014.
86. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, et al. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLoS One*; 7(10): 1–8. 2012.
  87. Palmer LJ, Cooper PR, Ling MR, Wright HJ, Huissoon A, Chapple ILC. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol*; 167(2): 261–8. 2012.
  88. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol*; 3: 1–8. 2012.
  89. Schorn C, Janko C, Krenn V, Zhao Y, Munoz LE, Schett G, et al. Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front Immunol*; 3: 1–6. 2012.
  90. Pang L, Hayes CP, Buac K, Yoo D -g., Rada B. Pseudogout-Associated Inflammatory Calcium Pyrophosphate Dihydrate Microcrystals Induce Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J Immunol*; 190(12): 6488–500. 2013.
  91. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*; 6: 1–21. 2017.
  92. Naccache PH, Fernandes MJG. Challenges in the characterization of neutrophil extracellular traps: The truth is in the details. *Eur J Immunol*; 46(1): 52–5. 2016.
  93. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol*; 7(2): 75–7. 2011.
  94. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - The dark side of neutrophils. *J Clin Invest*; 126(5): 1612–20. 2016.
  95. Jorch SK, Kuberski P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*; 23(3): 279–87. 2017.
  96. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One*; 7(2): 1–14. 2012.
  97. Kimball AS, Obi AT, Diaz JA, Henke PK. The emerging role of NETs in venous thrombosis and immunothrombosis. *Front Immunol*; 7: 1–8. 2016.
  98. Fadini GP, Menegazzo L, Scattolini V, Gintoli M, Albiero M, Avogaro A. A perspective on

- NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*; 26(1): 1–8. 2016.
99. Obermayer A, Stoiber W, Krautgartner WD, Klappacher M, Kofler B, Steinbacher P, et al. New aspects on the structure of neutrophil extracellular traps from chronic obstructive pulmonary disease and in vitro generation. *PLoS One*; 9(5): 1–9. 2014.
  100. Döring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. *Circ Res*; 120(4): 736–43. 2017.
  101. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Hahn S. Neutrophil NETs: A novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Semin Immunopathol*; 29(2): 163–7. 2007.
  102. Porto BN, Stein RT. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: Too much of a good thing? *Front Immunol*; 7: 1–13. 2016.
  103. Cortjens B, De Boer OJ, De Jong R, Antonis AFG, Sabogal Piñeros YS, Lutter R, et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J Pathol*; 238(3): 401–11. 2016.
  104. Knight JS, Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front Immunol*; 3: 1–12. 2012.
  105. Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*; 14(8): 467–75. 2018.
  106. Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, Kühn LI, Ben-Ezra J, Elhasid R, et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol*; 4: 1–5. 2013.
  107. Kaplan JM. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity 1. *J Immunol*; 189(6): 2689–95. 2013.
  108. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: A novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging Cell*; 13(4): 690–8. 2014.
  109. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker JM, Mooren FC, et al. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol*; 117(3): 325–33. 2014.
  110. Yu Y, Koehn CD, Yue Y, Li S, Thiele GM, Hearsh-Holmes MP, et al. Celastrol inhibits inflammatory stimuli-induced neutrophil extracellular trap formation. *Curr Mol Med*; 15(4): 401–10. 2015.

111. Kamoshida G, Kikuchi-Ueda T, Nishida S, Tansho-Nagakawa S, Kikuchi H, Ubagai T, et al. Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps in serum-free culture conditions. *FEBS Open Bio*; 7(6): 877–86. 2017.
112. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*; 8(3): 883–96. 2014.
113. Metzler KD, Fuchs T a, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation : implications for innate immunity Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation : implications for innate immunity. *Blood*; 117(3): 953–9. 2011.
114. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol*; 92(4): 841–9. 2012.
115. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*; 21(2): 290–304. 2011.
116. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*; 184(2): 205–13. 2009.
117. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun*; 1(3): 194–201. 2009.
118. Stojkov D, Amini P, Oberson K, Sokollik C, Duppenhaler A, Simon HU, et al. ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*; 216(12): 4073–90. 2017.
119. Rodríguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Moreno-Altamirano MMB, López-Villegas EO, Sánchez-García FJ. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology*; 145(2): 213–24. 2015.
120. Yipp BG, Kubes P, Dc W, Yipp BG, Kubes P. NETosis : how vital is it? *Blood*; 122(16): 2784–94. 2013.
121. Desai J, Mulay SR, Nakazawa D, Anders HJ. Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is “NETosis” = necroptosis? *Cell Mol Life Sci*; 73(11–12): 2211–9. 2016.
122. Kral JB, Schrottmaier WC, Salzmann M, Assinger A. Platelet Interaction with Innate

- Immune Cells. *Transfus Med Hemotherapy*; 43(2): 78–88. 2016.
123. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*; 10(11): 1325–34. 2010.
  124. Lumbroso D, Soboh S, Maimon A, Schif-Zuck S, Ariel A, Burstyn-Cohen T. Macrophage-derived protein S facilitates apoptotic polymorphonuclear cell clearance by resolution phase macrophages and supports their reprogramming. *Front Immunol*; 9: 10–3. 2018.
  125. Jiang C, Liu Z, Hu R, Bo L, Minshall RD, Malik AB, et al. Inactivation of Rab11a GTPase in macrophages facilitates phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol*; 198(4): 1660–72. 2017.
  126. Kim J, Bae JS. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm*; 2016: 6058147. 2016.
  127. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*; 124(5): 710–9. 2014.
  128. Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol*; 30(11): 522–30. 2009.
  129. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*; 115(2): 335–43. 2010.
  130. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol*; 188(7): 3150–9. 2012.
  131. Denkers EY, Del Rio L, Bennouna S. Neutrophil Production of IL-12 and Other Cytokines during Microbial Infection. *The Neutrophil*; 83: 95–114. 2003.
  132. Yang C, Strong BSI, Miller MJ, Unanue ER. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol*; 185(5): 2927–34. 2010.
  133. Rodriguez FM, Rinero R, Reyna MV, Vargas AH, Carabajal Miotti CL, Gonzalez Silva EN, et al. MHC II (HLA-DR) on PMNs Stimulated with LPS in Autologous Culture of Total Human Leukocytes with Positive Serology for Chagas Disease. *ARC J Immunol Vaccines*; 2(2): 1–6. 2017.
  134. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen P, et al. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science*; 285(5425): 221–7. 1999.

135. Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, et al. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol*; 2(12): 1159–66. 2001.
136. Dustin ML, Cooper JA. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol*; 1(1): 23–9. 2000.
137. Lee K-H. T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation. *Science*; 295(5559): 1539–42. 2002.
138. Pettmann J, Santos AM, Dushek O, Davis SJ. Membrane ultrastructure and T cell activation. *Front Immunol*; 9: 1–9. 2018.
139. Basu R, Huse M. Mechanical communication at the immunological synapse. *Trends Cell Biol*; 27(4): 1–23. 2017.
140. Porciello N, Tuosto L. CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling. *Cytokine Growth Factor Rev*; 28(2015): 11–9. 2016.
141. Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol*. 25(6): 323–7. 2004.
142. Bustos-Morán E, Blas-Rus N, Martín-Cófreces NB, Sánchez-Madrid F. Orchestrating Lymphocyte Polarity in Cognate Immune Cell – Cell Interactions. *Int Rev Cell Mol Biol*; 327: 195–261. 2016.
143. Schwindling C, Quintana A, Krause E, Hoth M. Mitochondria Positioning Controls Local Calcium Influx in T Cells. *J Immunol*; 184(1): 184–90. 2010.
144. Bonifaz LC, Cervantes-Silva MP, Ontiveros-Dotor E, López-Villegas EO, Sánchez-García FJ. A role for mitochondria in antigen processing and presentation. *Immunology*; 144(3): 461–71. 2015.
145. Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, et al. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci*; 104(36): 14418–23. 2007.
146. Cabral HR, Novak I. Spontaneous formation of rosettes by autologous human monocyte-macrophages and lymphocytes in cell cultures. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*; 50(2): 25–6. 1992.
147. Cabral HRA, Novak ITC. Autologous rosette formation by human blood monocyte-derived macrophages and lymphocytes. *Am J Hematol*; 60(4): 285–8. 1999.
148. Novak I, Cabral H. Rosette formation by macrophages with adhered T lymphocytes is precluded by inhibitors of antigen processing and presentation. *Biocell*; 32(2): 169–74.



2008.

149. Kim HR, Mun YV, Lee KS, Park YJ, Park JS, Park JH, et al. T cell microvilli constitute immunological synaptosomes that carry messages to antigen-presenting cells. *Nat Commun*; 9(1): 1–19. 2018.
150. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose ? *Nat Immunol*; 4(9): 815. 2003.
151. Smyth CM, Logan G, Boadle R, Rowe PB, Smythe JA, Alexander IE. Differential subcellular localization of CD86 in human PBMC-derived macrophages and DCs, and ultrastructural characterization by immuno-electron microscopy. *Int Immunol*; 17(2): 123–32. 2005.
152. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*; 174(3): 561–9. 1991.
153. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev*; 229(1): 5–11. 2009.
154. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science*; 332(6029): 600–3. 2011.
155. Altmann DM. A Nobel Prize-worthy pursuit: cancer immunology and harnessing immunity to tumour neoantigens. *Immunology*; 155(3): 283–4. 2018.
156. Leach D, Krummel M, Allison J. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*; 271(23): 1734. 1996.
157. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*; 11(11): 3887–95. 1992.
158. Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol*; 21(2): 69–77. 2009.
159. Horn LA, Long TM, Atkinson R, Clements V, Ostrand-Rosenberg S. Soluble CD80 protein delays tumor growth and promotes tumor infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Res*; 6(1): 59–68. 2017.
160. Marín LA, Moya-Quiles MR, Miras M, Minguela A, Bermejo J, Ramírez P, et al. Evolution of soluble forms of CD86, CD95 and CD95L molecules in liver transplant recipients. *Transpl Immunol*; 26(2–3): 94–100. 2012.
161. Simone R, Pesce G, Antola P, Rumbullaku M, Bagnasco M, Bizzaro N, et al. The soluble form of CTLA-4 from serum of patients with autoimmune diseases regulates T-cell responses. *Biomed Res Int*; 2014: 1–9. 2014.

162. Wong CK, Lit LCW, Tam LS, Li EK, Lam CWK. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*; 44(8): 989–94. 2005.
163. Sandilands GP, Ahmed Z, Perry N, Davison M, Lupton A, Young B. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*; 114(3): 354–68. 2005.
164. Sandilands GP, McCrae J, Hill K, Perry M, Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*; 119(4): 562–71. 2006.
165. Ishikawa F, Miyazaki S. New biodefense strategies by neutrophils. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*; 53(3): 226–33. 2005.
166. Iking-konert C, Vogt S, Radsak M, Wagner C, Hänsch GM, Andrassy K. Polymorphonuclear neutrophils in Wegener 's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int*; 60(2001): 2247–62. 2001.
167. Cross A, Bucknall RC, Cassatella MA, Edwards SW, Moots RJ. Synovial Fluid Neutrophils Transcribe and Express Class II Major Histocompatibility Complex Molecules in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*; 48(10): 2796–806. 2003.
168. Matsushima H, Geng S, Lu R, Okamoto T, Yao Y, Mayuzumi N, et al. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*; 121(10): 1677–89. 2013.
169. Culshaw S, Millington OR, Brewer JM, McInnes IB. Murine neutrophils present Class II restricted antigen. *Immunol Lett*; 118(1): 49–54. 2008.
170. Ostanin D V, Kurmaeva E, Furr K, Bao R, Hoffman J, Berney S, et al. Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *J Immunol*; 188(3): 1491–502. 2012.
171. Abdallah DSA, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*; 23(5): 317–26. 2011.
172. Takashima A, Yao Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J Leukoc Biol*; 98: 1–8. 2015.
173. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*; 97: 77–89. 1968.

174. English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods*; 5(3): 249–52. 1974.
175. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 7<sup>o</sup> ed. Barcelona, España. Elsevier. 1-546. 2012.
176. Leliefeld PHC, Koenderman L, Pillay J. How neutrophils shape adaptive immune responses. *Front Immunol*; 6: 1–8. 2015.
177. Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Loré K. Neutrophils acquire antigen presentation capacity to memory CD4<sup>+</sup> T cells in vitro and ex vivo. *Blood*; 129(14): 1991–2001. 2017.
178. Haim H, Si Z, Madani N, Wang L, Courter JR, Princiotta A, et al. Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state. *PLoS Pathog*; 5(4): 1–14. 2009.
179. Barrientos L, Marin-Esteban V, Chaisemartin L de, Le-Moal VL, Sandré C, Bianchini E, et al. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*; 4: 1–10. 2013.
180. Maletto BA, Ropolo AS, Alignani DO, Liscovsky M V., Ranocchia RP, Moron VG, et al. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood*; 108(9): 3094–102. 2006.
181. Cunha AA Da, Porto BN, Nuñez NK, Souza RG, Vargas MHM, Silveira JS, et al. Extracellular DNA traps in bronchoalveolar fluid from a murine eosinophilic pulmonary response. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*; 69(12): 1696–700. 2014.
182. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*; 14(9): 949–53. 2008.
183. Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, Karasuyama H, et al. NADPH Oxidase-Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. *J Immunol*; 192(11): 5314–23. 2014.
184. Muñoz-Caro T, Silva LMR, Ritter C, Taubert A, Hermosilla C. *Besnoitia besnoiti* tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. *Parasitol Res*; 113(11): 4189–97. 2014.
185. Boe DM, Curtis BJ, Chen MM, Ippolito JA, Kovacs EJ. Extracellular traps and macrophages: new roles for the versatile phagocyte. *J Leukoc Biol*; 97(6): 1023–35. 2015.

186. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. *Front Immunol*; 3: 1–11. 2012.
187. Ueki S, Tokunaga T, Fujieda S, Honda K, Hirokawa M, Spencer LA, et al. Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*; 16(8). 2016.
188. Mu H, Humphreys J, Chan FV, Cole BC. TLR2 and TLR4 differentially regulate B7-1 resulting in distinct cytokine responses to the mycoplasma superantigen MAM as well as to disease induced by *Mycoplasma arthritidis*. *Cell Microbiol*; 8(3): 414–26. 2006.
189. Rodriguez FM, Novak ITC. What about the neutrophils phenotypes? *Hematol Med Oncol*; 2(3): 1–6. 2017.
190. Sagiv JY, Michaeli J, Fridlender ZG, Granot Z, Assi S, Mishalian I, et al. Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Reports*; 10: 562–73. 2015.
191. Hellebrekers P, Vrisekoop N, Koenderman L. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur J Clin Invest*; 48: 1–9. 2018.
192. Rodriguez FM, Novak ITC. Costimulatory Molecules CD80 and CD86 Colocalized in Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *J Immunol Infect Dis*; 3(1): 1–9. 2016.
193. Ohkubo T, Takei M, Mitamura K, Horie T, Fujiwara S, Shimizu K, et al. Increased Soluble CD4 Molecules and the Role of Soluble CD4 Production in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Int Med Res*; 29: 488–96. 2001.
194. Berthelot JM, Le Goff B, Neel A, Maugars Y, Hamidou M. NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis. *Jt Bone Spine*; 84(3): 255–62. 2017.
195. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev Cell*; 44(5): 542–53. 2018.

## **PUBLICACIONES DERIVADAS**

## Publicaciones derivadas del trabajo de Tesis

Costimulatory molecules CD80 and CD86 colocalized in Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Rodríguez FM and Novak ITC. *J Immunol Infect Dis* 2016. 3(1): 103. 9p. ISSN: 2394-6512

May NETs Contain Costimulatory Molecules? Rodríguez FM and Novak ITC. *J Immuno Biol* 2016, 1:113. 2p. DOI: 10.4172/2476-1966.1000113. ISSN 2476-1966

What about the neutrophils phenotypes? Rodriguez FM and Novak ITC *Hematol Med Oncol*, 2017 doi:10.15761/HMO.1000130 Review Article. *Hematology & Medical Oncology* 2(3): 1-6

## Presentaciones derivadas del trabajo de Tesis en congresos y Jornadas científicas

CD80 and CD86 colocalized in NETs. Rodríguez FM and Novak IT. Poster presentado en *ECI 2015-4th European Congress of Immunology - Vienna, Austria 6-9 September, 2015*. Publicado en Abstracts Book.

Moléculas CD80 y CD86 son colocalizadas en trampas extracelulares neutrófilas (NETs), Rodriguez FM, Novak ITC. poster *JIC, FCM, UNC*. Córdoba. Octubre 2015. Resumen publicado en *Rev Fac Med, UNC*.

NE, CD80 and CD86 colocalized in NETs. Rodriguez FM, Novak ITC. Poster presentado en *ICI-2016, International Congress of Immunology, Melbourne, Australia. 21-26 August, 2016*. Publicado en Abstracts Book.

HLA-DR, CD4 and CD45-RO in neutrophils extracellular traps. Rodriguez FM, Novak ITC. Poster presentado en *5th European Congress of Immunology ECI 2018*. Amsterdam, 2-6 September 2018. Publicado en Abstracts Book.

Mitochondrial dynamic, beta tubulin and extracellular traps in cultures of human autologous leukocytes stimulated with LPS. Rinero R, Reyna MV, Rodriguez FM, Novak ITC. Poster presentado en *5th European Congress of Immunology ECI 2018*. Publicado en Abstracts Book. Amsterdam, 2-6 September 2018. Publicado en Abstracts Book.

Dinámica mitocondrial, beta-tubulina y trampas extracelulares en cultivos autólogos de leucocitos humanos estimulados con LPS. Rinero R, Reyna MV, Rodríguez FM, Novak ITC. poster JIC, FCM, UNC. Córdoba. Octubre 2018. Resumen publicado en Rev Fac Med, UNC.

### ***Otras publicaciones desde 2014***

Rodríguez FM, Orquera AD, Maturano MR, Infante NS, Carabajal Miotti C, González Silva N and Novak ITC. Human neutrophils in patients with positive serology for Chagas disease. *J Immunol Infect Dis* 2016. 3(1): 101-8.

Rodríguez FM, Vargas A, Miotti CC, Silva NG, Frattari SR, Novak IT. Extracellular Traps and Co-Stimulatory Molecules in Leukocytes of Patients with Positive Serology for Chagas Disease. 2017 *MOJ Immunol* 5(4): 00163. DOI: 10.15406/moji.2017.05.00163

Rodríguez FM, Rinero R, Reyna MV, Vargas AH, Carabajal Miotti CL, Gonzalez Silva NE, Ruiz de Frattari S, Novak ITC. MHC II (HLA-DR) on PMNs Stimulated with LPS in Autologous Culture of Total Human Leukocytes with Positive Serology for Chagas Disease. *ARC Journal of Immunology and Vaccines*. 2017; 2(2): 1-6.

### ***Otras presentaciones en congresos y Jornadas científicas***

Neutrophils of Patients with Chagas Positive Serology in Autologous Culture. Rodríguez FM, Orquera AD, Maturano MR, Infante NS, Novak ITC. aceptado en ASCB/EMBO . Abstract publicado en *Mol. Biol. Cell*. 2014. 25 (suppl), abstract.

Trampas extracelulares in vitro y moléculas coestimuladoras en leucocitos humanos con serología positiva para Chagas Rodríguez FM, Vargas AH, Carabajal Miotti CL, González Silva NE, Ruiz de Frattari SG, Novak ITC. JIC, FCM, UNC. Córdoba. Octubre 2016. (Este trabajo fue preseleccionado para premio de las JIC). Resumen publicado en Rev Fac Med, UNC.

Trampas extracelulares in vitro y moléculas coestimuladoras en leucocitos humanos con serología positiva para Chagas. Rodríguez FM, Vargas AH, Carabajal Miotti CL, González Silva NE, Ruiz de Frattari SG, Novak ITC. Poster presentado en *XVII JIC, FCM, UNC*. Córdoba. Octubre 2016. Este trabajo fue preseleccionado para premio de las JIC. Resumen publicado en *Rev Fac Med, UNC*

Extracellular traps in vitro and co-stimulatory molecules in human leukocytes with positive serology for Chagas disease. Rodríguez FM, Vargas AH, Carabajal Miotti CL, González Silva NE, Ruiz de Frattari SG, Novak ITC Poster en *Annual Meeting ASCB/EMBO, San Francisco, CA, USA*, December 3-7, 2016. Publicado en *Mol. Biol. Cell*. 2016. 27 (suppl), abstract .

HLA-DR en PMNs en cultivos autólogos de leucocitos totales humanos con serología positiva para Chagas estimulados con LPS. Rodríguez FM, Rinero R, Reyna MV, Vargas AH, Carabajal Miotti CL, González Silva NE, Ruiz de Frattari SG, Novak ITC. Poster presentado en *JIC, FCM, UNC*, 19 de Octubre de 2017. Este trabajo fue preseleccionado para premio de las JIC. Resumen publicado en *Rev Fac Med, UNC*

HLA-DR in PMNs in autologous cultures of human total leukocytes with positive serology for Chagas stimulated with LPS. Rodríguez FM, Rinero R, Reyna MV, Vargas AH, Carabajal Miotti CL, González Silva NE, Ruiz de Frattari SG, Novak ITC. Poster presentado en *ASCB/EMBO Meeting, Philadelphia, PA, USA* December 2017.



# Costimulatory Molecules CD80 and CD86 Colocalized in Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Rodriguez FM and Novak ITC\*

Institute of Cell Biology, Faculty of Medical Sciences, National University of Cordoba, Argentina

\*Corresponding author: Novak ITC, Enrique Barrios corner Gordillo. Ciudad Universitaria, (5000) Cordoba, Argentina, Tel: 00 54 351 433 4020, E-mail: inovak@cmefcm.uncor.edu

**Citation:** Rodriguez FM, Novak ITC (2016) Costimulatory Molecules CD80 and CD86 Colocalized in Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *J Immunol Infect Dis* 3(1): 103

## Abstract

Neutrophil extracellular traps (NETs) have been proposed as vehicles for the sensitization of T cells by decreasing their activation threshold. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) activated *in vitro* may express molecules normally associated with antigen presenting cells (APCs). May NETs contain costimulatory molecules? We perform the generation of NETs in autologous leukocytes cultures, stimulated with lipopolysaccharide (LPS) or ovalbumin (OVA). We marked of B7-1(CD80) and B7-2(CD86) costimulatory molecules. In LPS and OVA assays CD80 was found colocalized with CD86 in the released NETs at 30 min. In LPS assay at 120 min CD80 and CD86 colocalized with neutrophil elastase (NE) in NETs. These costimulatory molecules were detected on the cell surface at 30 min and 24 h but not in the control paired blood samples. In OVA assays fewer NETs were observed. We generated Monocyte-macrophage Lymphocytic Rosettes (MLRs) with OVA stimulation. A higher number of MLRs was formed in samples with presence of CD80 and CD86 in NETs. The expression of costimulatory molecules in NETs would allow PMNs to exert function as APCs and modulatory functions of various subpopulations of T cells. The presence of CD80 and CD86 in NETs could influence the cell environment through the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway. This is the first communication of CD80 and CD86 costimulatory molecules in NETs.

**Keywords:** CD80; CD86; NETs; Human neutrophils; Costimulatory molecules

## Introduction

While polymorphonuclear (PMN) neutrophils play a crucial role in protecting against infection, recent evidence suggests that participation plays a key role in innate and adaptive responses mechanisms as effectors and regulators [1,2]. In inflammatory conditions, PMN neutrophils can release extracellular traps (NETs) [3,4] composed of chromatin, histone and granule proteins, which trap and kill a variety of microbes. Immunity has been proposed as second function of chromatin released in NETs [5]. The formation of NETs with sterile inflammatory stimuli from crystals of monosodium urate (MSU) has been of great importance in patients with gout [6]. Neutrophil extracellular traps (NETs) have been proposed as vehicles for the sensitization of T cells by decreasing their activation threshold, linking innate and adaptive immune responses [7]. NETs have also been implicated in autoimmunity, thrombosis and tissue injury [8] and in cancer immunoediting [9].

The mechanism of NET formation implicate morphological changes of PMN: after activation, the cells flatten and they attach to the substratum, the nucleus loses the lobules and the chromatin decondenses Nuclear membranes progressively lose their integrity. At the same time, granules desintegrate. Elastase migrates from the azurophilic granules to the nucleus and partially degrades histones promoting chromatin decondensation, myeloperoxidase synergizes this action [10]. After 1 hour, the components of nucleus and cytoplasm mix. Finally, the plasmatic membrane ruptures and ejects the interior of the cell to the extracellular space forming NETs [5]. Two mechanisms for the release of NETs in response to various stimuli are described: 1. early, quick release (5 to 60 minutes after *in vitro* stimulation with *Staphylococcus aureus* or lipopolysaccharide (LPS) and 2. slow (2 to 4 hours) leading to the death of the PMN "NETosis" [11]. Some authors summarize the release of NETs as "vital NETosis" in the case of PMN which are still alive, or as "lytic suicide NETosis" when drifting in the death of PMN [12,13].

PMNs activated *in vitro* may express molecules normally associated with antigen presenting cells required for T cell activation. B7 molecules (B7-1/CD80 and B7-2/CD86) are integral membrane glycoproteins that are expressed on the surface of APCs. CD86 exhibits constitutive expression on resting monocytes, macrophages and dendritic cells. In the same cells without stimulation CD80 expression is absent or low [14]. Engagement neutrophil CD11b receptor results in rapid surface expression of molecules required for antigen presentation and T cell activation, such as MHCII HLA-DR, CD80 and CD86. These costimulatory molecules are pre-formed in cytoplasmic reservoirs and are translocated to the surface with the engagement of certain receptors as MAC-1

(CD18 + CD11b) [15]. T cell activation initiates with a first signal, the interaction of the antigenic peptide/major histocompatibility complex with the TCR, and a second signal, the “costimulatory signal”. The absence of costimulation in naive T cells results in antigen-specific unresponsiveness [16,17]. The second signal can be stimulatory or inhibitory, this depends on the receptor [17,18]. The B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway is the best characterized T-cell costimulatory pathway [19,20]. CD28 is constitutively expressed on naive T cells; in contrast, expression of CTLA-4 is induced upon T cell activation. Activated T cells as well as regulatory T cells (Treg) with a pivotal role in the maintenance of peripheral self tolerance, express CTLA-4 [21]. The inhibitory receptor CTLA-4 (CD152) was found to be a higher affinity binding for CD80 and CD86, as compared to CD28 [22]. Transendocytosis of CD80 and CD86 by CTLA4 has been described. CTLA-4 captures ligands (CD80 and CD86) from APC and degrades them inside the CTLA-4-expressing cell. This process removes B7 molecules from neighboring cells and these results in impaired costimulation via CD28 [21,23].

In this study we have investigated the possibility of localization of costimulatory molecules in NETs. In the present work we perform assays to generate NETs in autologous leukocytes cultures, challenged with LPS and OVA and mark CD80 and CD86 costimulatory molecules. We have decided to use LPS; because it is one of the most recognized PMN activators, and OVA because in other granulocytes it induces formation of extracellular traps [24] and we have investigated the possibility of generating NETs. An experiment with T cells was performed in order to assess potential functional relevance of CD80 and CD86 colocalized in NETs. We generated immunological synapses in Monocyte-macrophage Lymphocytic Rosettes (MLRs) [25-28] with addition of OVA (heterologous antigen) in total autologous leukocyte cultures. It has been described that lymphocytes forming MLRs are T-CD4 cells [26]. In a previous study we showed that addition of heterologous antigen stimulated MLR phenomenon in cultures of purified mononuclear cells [28].

## Materials and Methods

### Blood samples

Heparinized human blood samples ( $n = 10$ ) were collected with ethical consent according to procedures approved by ethical committee of National Hospital Clinicas R169/13, I minute book N129. Samples donated by the Blood Bank, Institute of Hematology and Hemotherapy of the National University of Cordoba in anonymity, with negative serology: Hudleson (Wiener), VDRL (Wiener), Chagas HAI (Wiener) Chagas EIE (Biomerieux), HBs EIE (Biomerieux), HbC (Biomerieux), HCV EIE (Murex), HIV Ac EIE (Biomerieux), HIV Ag EIE (Biomerieux), HTLV EIE (Murex).

### Autologous cell cultures

Blood samples were allowed to sediment for 2 hours. Plasma supernatants containing all types of leukocytes were separated and were cultured at 37 °C in TC199 medium (Sigma, St-Louis, MO) supplemented with L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO), added with filtered serum from the same donor. A 24-well cell culture plate was prepared by putting a sterile 13 mm round glass cover slip into each well.

### NET formation

Cultured cells were stimulated with LPS to form NETs. (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich) 25 ng/ml or OVA 100 µg/ml (Ovalbumin, Difco, Detroit, Michigan) at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator. Samples: 30 minutes, some experiments at 120 minutes and 24 hours. The released NETs were visualized by fluorescence microscopy using DAPI (4,6'-diamidino-2- phenylindole) (Sigma, St Louis, MO) and anti-Neutrophil Elastase (anti-NE, Abcam).

### NETs quantification

The released NETs were visualized by immunofluorescence microscopy and the percentage of cells releasing NETs and the percentage of cells with CD80 and CD86 colocalized in NETs was calculated as the average of six fields (400x) normalized to the total number of cells.

### Samples for (IF) Immunofluorescence

Glass cover slips with attached cells were carefully removed from culture plate and IF techniques were performed.

### NE immunofluorescence staining

Cultured cells after stimulation with LPS for 30 and 120 minutes washed briefly in PBS (phosphate buffered saline), fixation was performed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and washed in three changes in PBS. It was permeabilized in 0.25% Triton x-100 in PBS. It was incubated with 5% blocking serum albumin in PBS to prevent non-specific staining for 20 minutes. It was washed with PBS. It was incubated with a primary antibody anti-NE (rabbit Abcam) for one hour at 37 °C, washed in PBS and further incubated for one hour at 37 °C with goat anti-rabbit IgG secondary antibody Alexa Fluor® 594 conjugated or with goat anti-rabbit IgG-FITC fluorescein isothiocyanate (Santa Cruz Biotechnology). It was washed with PBS and nuclear staining with DAPI (4,6'-diamidino-2- phenylindole) (Sigma, St Louis, MO). It was mounted with medium 90% glycerol in PBS. In all experiments, secondary antibody alone served as a negative control. Observation of preparations were performed in videomicroscope Axioscop 20, MC80, trinocular, Carl Zeiss. Paired blood samples provided controls.

## CD80 and CD86 immunofluorescence staining

After stimulation with LPS or OVA, culture cells washed briefly in PBS (phosphate buffered saline), fixation was performed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and washed in three changes in PBS. It was incubated with 5% blocking serum albumin in PBS to prevent non-specific staining for 20 minutes. It was washed with PBS. It was incubated with antibodies (Ab) Santa Cruz Biotechnology anti-CD80 (FITC; Santa Cruz Biotechnology), anti-CD86 (PE; Santa Cruz Biotechnology) at 4 °C overnight. It was washed with PBS and nuclear staining with DAPI (4,6'-diamidino-2- phenylindole) (Sigma, St Louis, MO). It was mounted with mounting medium 90% glycerol in PBS. Observation of preparations was done in videomicroscope Axioscop 20, MC80, trinocular, Carl Zeiss. Paired blood samples provided controls. We performed IF to CD80 and CD86 in samples from MLRs assay, see next section.

## MLRs Assay with OVA stimulation

Cultured total autologous leukocytes were stimulated with OVA. Samples of these cultures were harvested at 24 hours and centrifuged at 200 g and cytopreparations were made of each cell pellet by cytospin process at 82 g (Thermo Scientific Cytospin 4). Control experiments were leukocyte cultures of the same donors without OVA. We assessed the formation of rosettes between blood monocyte-macrophages and lymphocytes (MLRs) in cultures [25-27]. Cytopreparations from each experiment were stained with May Grünwald Giemsa or Toluidin blue. The study of the cytopreparations was made by videomicroscope Axioscop 20, MC80, trinocular, Carl Zeiss.

## MLRs quantification

A macrophage-lymphocytic rosette (MLR) was considered to be formed when a monocyte- macrophage was surrounded by three or more lymphocytes. The number of rosettes (MLRs) was expressed as the percentage of the number of macrophages that formed rosettes in a given cytopreparation by counting 100 macrophages.

## Statistical analysis

The data was presented as the mean value  $\pm$  SD ( $n = 10$ ) and represented at least three independent experiments from independent donors.  $***p < 0,001$  by paired Student's  $t$ -test using Infostat software. In MLR assay the data was presented as the mean value  $\pm$  SD ( $n = 3$ )  $**p < 0,01$  by paired Student's  $t$ -test using Infostat software.

## Results

### Generating NETs

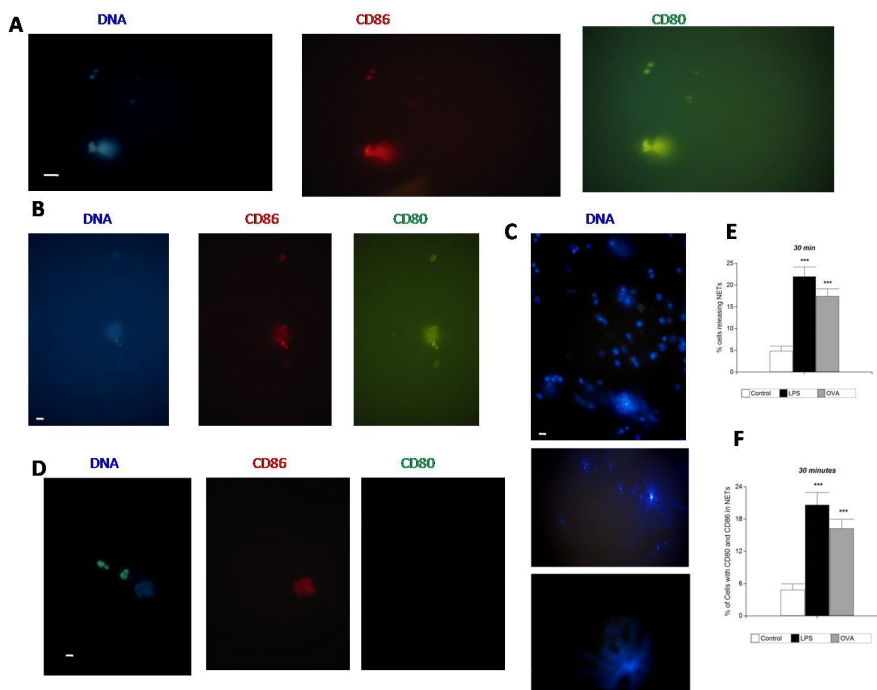
Cultured cells were stimulated to form NETs with LPS or OVA (Figures 1, 2 and 3). Presence of NETs was clearly showed by immunofluorescence staining of DNA with DAPI and one NETosis specific marker, the NE in LPS assays at 120 minutes (Figure 2B and 2C). NETs visualize as blue diffuse staining of DAPI (DNA) or chromatin distribution in numerous fibrils, or "spray" aspect, a phenomenon that externalizes the content of the cell, in all tests of stimulation with LPS (Figure 1A and 1C) at 30 minutes, at 120 minutes (Figure 2B and 2C) and 24 hours (Figure 3A) or OVA at 30 minutes (Figure 1B) and 24 hours (Figure 3C). We found that stimulation with LPS or OVA increased the basal levels of NETs from neutrophils derived from healthy donors (Figure 1E and 3D). In OVA assay at 30 min fewer cells releasing NETs were observed compared with assay at 24 hours, the analysis obtained showed a significant difference  $***p < 0.001$  (Figure 1E and 3D).

### Colocalization of CD80 and CD86

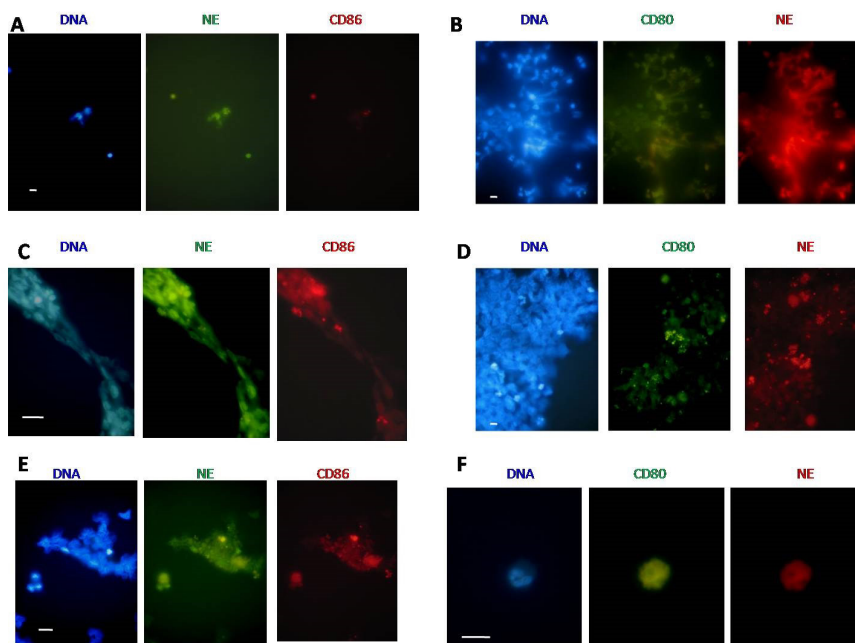
We performed the generation of NETs in autologous leukocytes cultures, stimulated with LPS or OVA and we marked CD80 and CD86 costimulatory molecules. The areas of red (CD86) and green (CD80) with immunofluorescence staining are identical, indicating colocalization in NETs. In LPS and OVA assays, CD80 was found to colocalize with CD86 in NETs released by stimulated PMNs at 30 minutes. These molecules are detected on the cell surface at 30 minutes (Figure 1A and 1B). In the control unstimulated paired blood samples at 30 min CD80 was negative and CD86 was found stained in some cells (Figure 1D). In LPS assay at 30 minutes the immunofluorescence staining showed NE granular appearance and CD86 was found in some cells (Figure 2A).

In LPS assay at 120 minutes CD80 (green) colocalizes with NE (red) in NETs (Figure 2B) and CD86 (red) colocalizes with NE (green) in NETs (Figure 2C). In the control unstimulated samples at 120 min of culture, NE (green) CD86 (red) (Figure 2E) and NE (red) CD80 (green) (Figure 2D and 2F) were found stained inside cells. We performed IF to CD80 and CD86 in samples from MLRs assay, see next section, and was found colocalization in NETs.

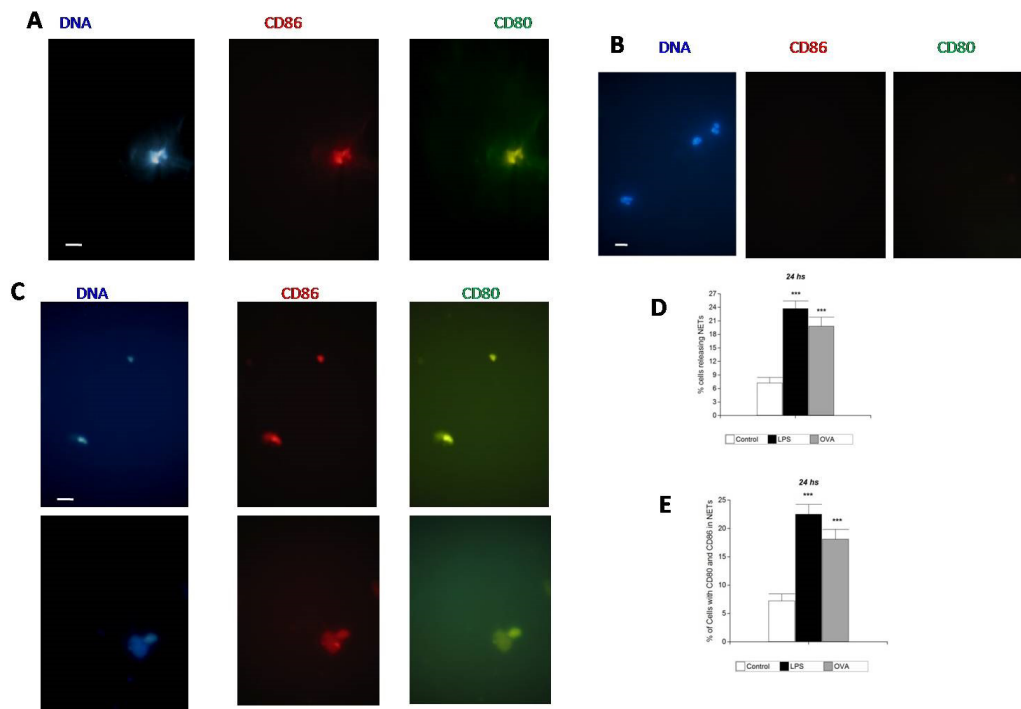
In LPS and OVA assays, CD80 was found to colocalize with CD86 in NETs released by stimulated PMNs at 24 hours (Figure 3A and 3C). In the control unstimulated samples at 24 hours CD80 and CD86 were negative. In OVA assay, fewer cells with CD80 and CD86 in NETs were observed compared with LPS assays, the analysis obtained showed a significant difference  $***p < 0.001$  (Figures 1F and 3E).



**Figure 1:** CD80 and CD86 colocalized in NETs after stimulation for 30 minutes; Immunofluorescence analysis, representative pictures from three independent experiments from independent donors; (A) Composite representative pictures of fluorescence microscopy showing CD80 (green) and CD86 (red). Pictures obtained after stimulation with LPS for 30 minutes. Scale bar represents 10  $\mu$ m; (B) Pictures obtained after stimulation with OVA for 30 minutes showing CD80 (green) and CD86 (red) colocalized in NETs. Scale bar represents 10  $\mu$ m; (C) Representative pictures obtained after stimulation with LPS for 30 minutes, DNA stained with DAPI (blue). Scale bar represents 10  $\mu$ m; (D) Representative picture obtained without stimulation (control paired blood samples). DNA stained with DAPI, CD80 (green) and CD86 (red). Scale bar represents 10  $\mu$ m; (E). Cells with stimulation with LPS or OVA for 30 minutes. The released NETs were visualized by immunofluorescence microscopy and the percentage of cells releasing NETs was calculated as the average of six fields (400x) normalized to the total number of cells. The data was presented as the mean value  $\pm$  SD of  $n = 10$  and represented at least three independent experiments from independent donors.  $***p < 0,001$  by paired Student's  $t$ -test; (F) Cells with stimulation with LPS or OVA for 30 minutes. The released NETs were visualized by immunofluorescence microscopy and the percentage of cells releasing NETs with CD80 and CD86 colocalized in NETs was calculated as the average of six fields (400x) normalized to the total number of cells. The data was presented as the mean value  $\pm$  SD of  $n = 10$  and represented at least three independent experiments from independent donors.  $***p < 0,001$  by paired Student's  $t$ -test



**Figure 2:** Immunofluorescence analysis of NE, CD80 and CD86. Representative pictures from three independent experiments from independent donors; (A) Pictures obtained after stimulation with LPS for 30 minutes. Scale bar represents 10  $\mu$ m. DNA stained with DAPI (blue), CD86 (red) and NE (green); (B) Pictures obtained after stimulation with LPS for 120 minutes. Scale bar represents 10  $\mu$ m. DNA stained with DAPI (blue), CD80 (green) and NE (red) colocalized in NETs; (C) Pictures obtained after stimulation with LPS for 120 minutes showing NE (green) and CD86 (red) colocalized in NETs. Scale bar represents 10  $\mu$ m; (D) Representative picture obtained without stimulation (control paired blood samples) at 120 min of culture time. DNA stained with DAPI, CD80 (green) and NE (red). Scale bar represents 10  $\mu$ m; (E) Representative picture obtained without stimulation (control paired blood samples) at 120 min of culture time. DNA stained with DAPI, NE (green) and CD86 (red). Scale bar represents 10  $\mu$ m; (F) Representative picture of PMN obtained without stimulation (control paired blood samples) at 120 min of culture time. DNA stained with DAPI, CD80 (green) and NE (red). Scale bar represents 10  $\mu$ m



**Figure 3:** CD80 and CD86 colocalized in NETs after stimulation for 24 hours. Immunofluorescence analysis, representative pictures from three independent experiments from independent donors; (A) Composite representative pictures of fluorescence microscopy showing CD80 and CD86 colocalized in NETs. DNA stained with DAPI (blue), CD80 (green) and CD86 (red). Pictures obtained after stimulation with LPS for 24 hours. Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ ; (B) Representative picture obtained without stimulation (control paired blood samples). DNA stained with DAPI, CD80 (green) and CD86 (red). Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ ; (C) Composite representative pictures obtained after stimulation with OVA for 24 hours showing CD80 (green) and CD86 (red) colocalized in NETs. Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ ; (D) Cells with stimulation with LPS or OVA for 24 hours. The released NETs were visualized by immunofluorescence microscopy and the percentage of cells releasing NETs was calculated as the average of six fields (400x) normalized to the total number of cells. The data was presented as the mean value  $\pm$  SD of  $n = 10$  and represented at least three independent experiments from independent donors.  $***p < 0,001$  by paired Student's  $t$ -test; (E) Cells with stimulation with LPS or OVA for 24 hours. The released NETs were visualized by immunofluorescence microscopy and the percentage of cells releasing NETs with CD80 and CD86 colocalized in NETs was calculated as the average of six fields (400x) normalized to the total number of cells. The data was presented as the mean value  $\pm$  SD of  $n = 10$  and represented at least three independent experiments from independent donors.  $***p < 0,001$  by paired Student's  $t$ -test

### Generating MLRs with OVA stimulation

Autologous leukocytes cultures were stimulated by addition of OVA heterologous antigen. Samples of these cultures were harvested at 24 hours and cytopreparations were made from cell pellets as described above in the MLR assay section. We observed the occurrence of MLRs in cell culture samples pelleted at 200g and in the same samples we found CD80 and CD86 colocalized in NETs by IF (Figures 4A, 4C and 4D). A higher number of MLRs was formed on the cytopreparations, as compared with controls without OVA. The analysis obtained showed a significant difference  $**p < 0.01$  (Figure 4B). We generated a higher number of MLRs with OVA stimulation in samples with presence of CD80 and CD86 in NETs.

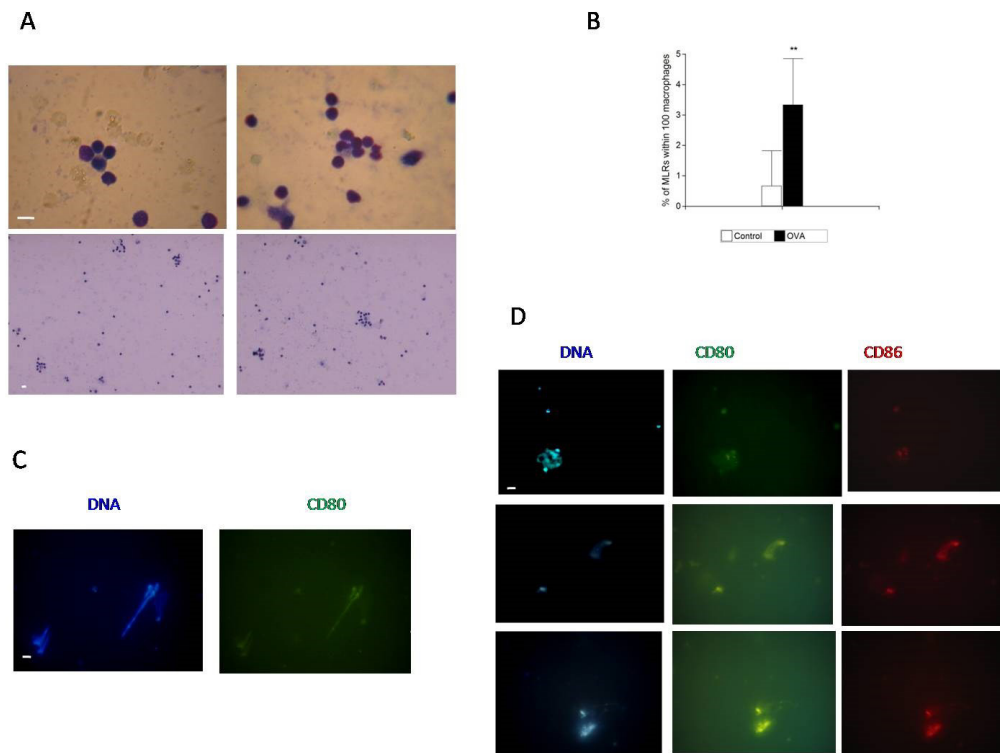
### Discussion

The mechanism of NETs' formation implies nuclear membranes and granules disintegrates. The components of nucleus and cytoplasm mix and the plasmatic membrane breaks and ejects the interior of the cell to the extracellular space, thus forming NETs [5].

It is described in the bibliography that B7 molecules can be pre-formed in cytoplasmic reservoirs. The granular components are part of the NETs, so we hypothesize that costimulatory molecules may also be found forming part thereof.

In this study, we perform assays to generate NETs in human autologous leukocytes cultures, and we marked CD80 and CD86 costimulatory molecules. The incubation with 5% blocking serum albumin in PBS to prevent non-specific staining was performed.

Sandilands *et al.* describe cytoplasmic reservoirs of molecules B7: CD80 mainly within secretory vesicles and CD86 within secondary, azurophilic granules and secretory vesicles [29]. In this work we found costimulatory molecules inside the cells in samples of unstimulated controls: at 30 minutes CD86 was positive, at 120 minutes CD86 and CD80 were positive but at 24 hours CD80 and CD86 were negative (Figures 1, 2 and 3). At 30 minutes CD86 was found stained in some cells in cell surface (Figure 1D). At 120 minutes CD86 was found in cytoplasm (Figure 2E) in control unstimulated paired blood samples and CD80 was found in cytoplasm (Figure 2D and 2F) in control unstimulated paired blood samples. The samples permeabilized (Figure 2) show stain inside the cells in cytoplasmic reservoirs of molecules CD80 and CD86 [29].



**Figure 4:** CD80 and CD86 colocalized in NETs and Monocyte-macrophage Lymphocytic Rosettes (MLRs) assay with OVA addition; (A) Composite representative pictures of light microscopy showing MLRs in samples of autologous leukocytes cultures after stimulation with heterologous antigen OVA for 24 h. Cytopreparations were stained with May Grünwald Giemsa or Toluidin blue. Scale bar represents 10  $\mu$ m; (B) Graph of Monocyte-macrophage Lymphocytic Rosettes (MLRs) assay with stimulation with heterologous antigen OVA for 24 h. A macrophage-lymphocytic rosette (MLR) was considered to be formed when a monocyte-macrophage was surrounded by three or more lymphocytes. The number of rosettes (MLRs) was expressed as the percentage of the number of macrophages that formed rosettes in a given cytopreparation by counting 100 macrophages. The data was presented as the mean value  $\pm$  SD ( $n = 3$ )  $**p < 0,01$  by paired Student's *t*-test using Infostat software; (C) Composite representative pictures of fluorescence microscopy showing CD80 (green), DNA stained with DAPI (blue) in samples of autologous leukocytes cultures after stimulation with heterologous antigen OVA for 24 h and MLRs assay performed. Scale bar represents 10  $\mu$ m; (D) Composite representative pictures of fluorescence microscopy showing CD80 (green) and CD86 (red), DNA stained with DAPI (blue) in samples of autologous leukocytes cultures after stimulation with heterologous antigen OVA for 24 h and MLRs assay performed. Scale bar represents 10  $\mu$ m

These findings are consistent with temporal expression pattern of molecules CD80 and CD86. It has been established that the cross linking of Mac 1 (CD11b+CD18) results in the translocation of CD80, CD86 and HLA-DR on the surface of normal human peripheral blood PMNs. This represents one way of PMN activation. There are many well documented neutrophils activators. Between the activators, LPS is one of the most recognized. LPS stimulates the release of secretory vesicles [29] and NETs release [11]. In our present study released NETs were confirmed by immunofluorescence staining of DNA with DAPI and one NETosis specific marker like NE. NETs are fragile structures [5]. The mixture of cytoplasm and nucleoplasm gets expelled to form NETs [5]. NETs visualize as blue diffuse staining of DAPI (DNA) or chromatin distribution in numerous fibrils, or "spray" aspect in all tests of stimulation with LPS (Figure 1A, 1C, 2B, 2C, and 3A) or OVA (Figure 1B and 3C). In LPS assay at 30 minutes the immunofluorescence staining showed NE granular appearance and CD86 was found in some cells (Figure 2A). At 30 min NE localizes inside azurophilic granules. It has been described that NE localized to the nucleus 60 min after stimulation, accompanied by reduced granular staining [10]. NE migrates from the azurophilic granules to the nucleus and partially degrades histones promoting chromatin decondensation in NET formation process. In Figure 2B and 2C we showed results with NE at 120 min and NE colocalized with chromatin in agree with bibliography [10]. Colocalized molecules CD80 and CD86 with specific antibodies were observed. This finding would be possible because after the activation, neutrophils release NETs comprising decondensed chromatin associated with granular and cytosolic proteins. In stimulated samples CD80 and CD86 were detected on the cell surface and colocalized in NETs at 30 minutes (Figure 1A and 1B), 120 minutes (Figure 2B and 2C) and 24 hours (Figure 3A and 3C). The results in the control unstimulated paired blood samples at 30 minutes showed that CD80 was negative and CD86 was detected in some cells (Figure 1D) may be monocytic, in agreement with Smyth *et al.* (2004). In LPS assay at 120 minutes, CD86 and CD80 were found in control samples (Figure 2D and 2F).

Other researchers observed the presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. Although it has been generally accepted that neutrophils are not involved in adaptive responses, the uptake of OVA antigen by neutrophils was observed. These neutrophils principally secrete TNF alfa and authors conclude this would let them participate as immunomodulatory cells [30]. NETs were induced by immuno complexes OVA:anti-OVA [31] and in other granulocytes, formation of extracellular traps induced by OVA were described [24].

In the present study, we used whole blood to avoid spontaneous activation of neutrophils [29]. Having used whole blood, there are chances that other granulocytes produce extracellular traps (ET) too [24], but in the present work, we can attribute the generation of ETs to neutrophils because they represent 60-70% of the circulating leukocytes (lymphocytes represent 20-30% and them have not been described like ET generating cells) and because we used NE as a specific marker of NETs [24]. NETs have an “unique composition: chromatin tightly linked to neutrophil proteins such as NE, MPO, or calgranulin, and this definition excludes chromatin released by other forms of cell death” [5].

We observed NETs generation after stimulation with LPS or OVA at different times but in OVA assay we observed fewer cells with CD80 and CD86 in NETs ( $p < 0.001$ ). The results of OVA assays would be possibly from OVA alone and/or OVA-anti OVA immune complexes due to the possible existence of specific anti-OVA antibodies in serum of donors. Controls not stimulated with LPS or OVA, showed little or no expression of CD80 and CD86.

When we started this work, we observed in a first time (30 min), the presence of costimulatory molecules in NETs. As it is well known, PMN have a short life; however, under certain conditions of stimulation they can live more time. After 24 hours of culture we observed the release of NETs too, so we decided to detect if CD80 and CD86 could be present in NETs.

The importance of this finding resides in neutrophils functions, the possibility of acquire competence to be APC and playing a role in immunomodulation. The presence of CD80 and CD86 molecules in NETs would let them influence the cell environment, activation of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway can result in stimulation or inhibition of other cells, such as activated T cells or T reg cells. This finding could have relevance for a break in immune tolerance mediated by NETs. The CD80 and CD86 molecules have characteristics of key that opens different doors, in relation to receptor CD28 or CTLA4, therefore the effects will be different, opposite and the responses may be stimulatory, inhibitory or anergic, considering the complexity of diverse populations of T cells, naives and effectors. Accordingly these cells can modulate the immune response switching phenotypes and exert functions to interplay with other immune cells resulting in proinflammatory or antiinflammatory profiles [32]. Neutrophils demonstrate they are versatile cells, capable of modulating adaptive immune responses, and not simply limiting their role to phagocytosis, as was described at the beginning.

An experiment with T cells was performed to assess potential functional relevance of CD80 and CD86 colocalized in NETs. We generated immunological synapses in MLRs. The MLRs are a phenomenon of antigen processing and presentation [28]. It has been described that lymphocytes forming the rosettes MLRs are T-CD4 cells [26]. In a previous study we showed that addition of heterologous antigen stimulated MLRs in cultures of purified mononuclear cells [28]. In this work we performed a MLRs assay with addition of OVA (antigen heterologous) in total autologous leukocyte cultures and a higher number of MLRs was formed. In the same samples we found CD80 and CD86 colocalized in NETs by IF. Control experiments were leukocyte cultures of the same donors without OVA. In previous works we hypothesized that the presence of autologous neutrophils or of the materials derived from them during culturing, could provide a microenvironment that enhances the formation of MLRs because highest number of MLR occurred in total leukocyte samples, whereas only a few of them appeared in the mononuclear cell samples [26]. Here OVA was the heterologous antigen processed and presented besides the own antigens derived from senescent neutrophils considering the natural (spontaneous) death of neutrophils in this time of culture. In this study the presence of costimulatory molecules in NETs is not a requisite for the MLRs occurrence but it would be relevant in the presence of the higher number of MLRs because antigen processing and presentation are involved in MLR phenomenon like it was demonstrated experimentally in previous work [27]. CD80 and CD86 present in NETs may be responsible in part for modulating T response in MLRs, but the increment in MLRs after OVA stimulus may be a consequence of central monocyte-macrophage which express costimulatory molecules against heterologous stimulus besides NETs or not netotic PMN. This finding could have relevance for a break in immune tolerance mediated by NETs. This possibility requires elucidation by further works to demonstrate the impact of NETs on functions of T cells.

## Conclusion

In summary, we found CD80 and CD86 colocalized in NETs. The expression of costimulatory molecules in NETs would allow PMNs to play function as APCs and modulatory functions of various subpopulations of T cells. It needs to be probed with assays to evaluation of T cell responses. It is estimated of great interest the further study of the neutrophils phenotypes in interactions with other cell types. Experiments are currently underway to test it. This is the first communication of CD80 and CD86 costimulatory molecules in NETs and we consider it, a very significant finding for the immunological community.

## Acknowledgments

We thank the Blood Bank, Institute of Hematology and Hemotherapy, National University of Cordoba for donation of blood samples. We thank Dr Cristina Maldonado for providing the primary antibody anti-NE and secondary antibodies. We thank Professor Ana M. Granata for language editing of the work. We are also grateful to Reviewers whose comments helped us make amendments to our manuscript. We thank National University of Cordoba, Argentina, Science and Technology Secretary for supported this work.

## Funding Information

This work was supported by grants from the National University of Cordoba, Argentina, Science and Technology Secretary (SECYT, UNC R 379/15).

## References

1. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11: 519-31.
2. Phillipson M, Kubes P (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17: 1381-90.
3. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-5.
4. Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159-75.
5. Brinkmann V, Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198: 773-83.
6. Schorn C, Janko C, Krenn V, Zhao Y, Munoz LE, et al. (2012) Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front Immunol* 3: 10.3389/fimmu.2012.00376.
7. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M (2012) T Lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 188: 3150-9.
8. Barrientos L, Marin-Esteban V, de Chaisemartin L, Le-Moal VL, Sandré C, et al. (2013) An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* 4: 10.3389/fimmu.2013.00166.
9. Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, Kühn LI, Ben-Ezra J, et al. (2013) A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol* 4: 10.3389/fimmu.2013.00048.
10. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010) NE and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191: 677-91.
11. Branzk N, Papayannopoulos V (2013) Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol* 35: 513-30.
12. Kumar V, Sharma A (2010) Neutrophils: cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* 10: 1325-34.
13. Yipp BG, Kubes P (2013) NETosis: how vital is it? *Blood* 122: 2784-94.
14. Smyth CM, Logan G, Boadle R, Rowe PB, Smythe JA, et al. (2005) Differential subcellular localization of CD86 in human PBMC-derived macrophages and DCs, and ultrastructural characterization by immuno-electron microscopy. *Int Immunol* 17: 123-32.
15. Sandilands GP, Ahmed Z, Perry N, Davison M, Lupton A, et al. (2005) Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology* 114: 354-68.
16. Lafferty KJ, Andrus L, Prowse SJ (1980) Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses. *Immunol Rev* 51: 279-314.
17. Sharpe AH (2009) Mechanisms of Costimulation. *Immunol Rev* 229: 5-11.
18. Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13: 227-42.
19. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11: 211-6.
20. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, et al. (1987) A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328: 267-70.
21. Hou TZ, Qureshi OS, Wang CJ, Baker J, Young SP, et al. (2015) A transendocytosis model of CTLA-4 function predicts its suppressive behavior on regulatory T cells. *J Immunol* 194: 2148-59.
22. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, et al. (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174: 561-9.
23. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, et al. (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332: 600-3.
24. Cunha AA, Porto BN, Nuñez NK, Souza RG, Vargas MH, et al. (2014) Extracellular DNA traps in bronchoalveolar fluid from a murine eosinophilic pulmonary response. *Allergy* 69: 1696-700.
25. Cabral HR, Novak I (1992) Spontaneous formation of rosettes by autologous human monocyte- macrophages and lymphocytes in cell cultures. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 50: 25-6.
26. Cabral HR, Novak IT (1999) Autologous rosette formation by human blood monocyte-derived macrophages and lymphocytes. *Am J Hematol* 60: 285-8.
27. Novak IT, Cabral HR (2008) Rosette formation by macrophages with adhered T lymphocytes is precluded by inhibitors of antigen processing and presentation. *Biocell* 32: 169-74.
28. Novak I and Cabral H (2009) Immunological Synapses Formation: Rosettes between Human Autologous Cultured Monocyte-Macrophages and Lymphocytes, Proceedings of 2nd European Congress of Immunology. ECI, MEDIMOND International Proceedings, L913C0012, p.117-121
29. Sandilands GP, McCrae J, Hill K, Perry M, Baxter D (2006) Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* 119: 562-71.
30. Maletto BA, Ropolo AS, Alignani DO, Liscovsky MV, Ranocchia RP, et al. (2006) Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108: 3094-102.
31. Yu Y, Koehn CD, Yue Y, Li S, Thiele GM, et al. (2015) Celastrol Inhibits Inflammatory Stimuli-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Curr Mol Med* 15: 401-10.
32. Perobelli SM, Galvani RG, Goncalves-Silva T, Xavier CR, Nobrega A, et al. (2015) Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz J Med Biol Res* 48: 665-75.



Submit your next manuscript to Annex Publishers and benefit from:

- ▶ Easy online submission process
- ▶ Rapid peer review process
- ▶ Online article availability soon after acceptance for Publication
- ▶ Open access: articles available free online
- ▶ More accessibility of the articles to the readers/researchers within the field
- ▶ Better discount on subsequent article submission

Submit your manuscript at  
<http://www.annepublishers.com/paper-submission.php>

## May NETs Contain Costimulatory Molecules?

Fernando Marcos Rodriguez and Ivon Teresa Clara Novak\*

Institute of Cell Biology, Faculty of Medical Sciences, National University of Cordoba, Argentina

\*Corresponding author: Ivon Teresa Clara Novak, Institute of Cell Biology, Faculty of Medical Sciences, National University of Cordoba, Argentina, Tel: 00 54 351 433 4020; E-mail: inovak@cmebcm.uncor.edu

Received date: November 11, 2016; Accepted date: December 03, 2016; Published date: December 10, 2016

Copyright: © 2016 Rodriguez FM, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Keywords:** CD80; CD86; NETs; Human neutrophils; Costimulatory molecules

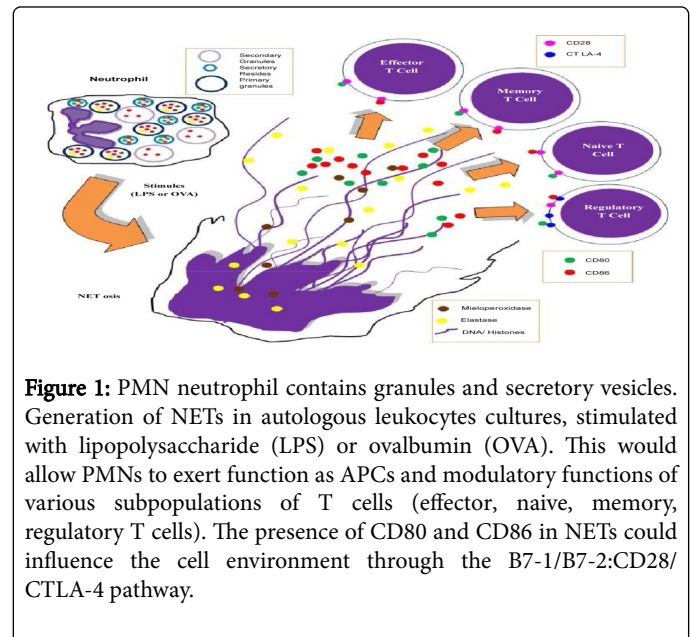
### Short communication

Since Neutrophil Extracellular Traps (NETs) were described in 2004 by Brikmann et al., they have been attributed to other functions in addition to catching and killing microorganisms [1]. As it is known, NETs are formed by chromatin and granular proteins which after stimulation are released to the extracellular environment [2].

Myeloperoxidase and neutrophil elastase are part of these structures and are actively involved in their release. The mechanism of NET formation implicates morphological changes of Polymorphonuclear (PMN) neutrophils: after activation, flattened and attached to the substratum, the nucleus of PMN lose their shape, the nuclear envelope and granules membrane disintegrate allowing the mixing of nuclear, cytoplasmic and granular components. Elastase migrates from the azurophilic granules to the nucleus and partially degrades histones, in this way promoting chromatin decondensation, and myeloperoxidase synergizes this action [3]. Finally the plasmatic membrane ruptures and ejects the interior of the cell to the extracellular space forming NETs [4]. NETs have not only been involved as defence mechanisms, but they have also been linked to tissue damage, thrombosis [5] autoimmunity and cancer immunoeediting [6]. In patients with gout it has been described the formation of NETs with sterile inflammatory stimuli from crystals of monosodium urate (MSU) [7].

Nets 'ability to lower the threshold of T cell activation has been described [8]. Costimulatory molecules are necessary for activation of T cells. The B7-1/B7- 2:CD28/CTLA-4 pathway is the best characterized T-cell costimulatory pathway [9,10]. T-cell activation requires a first signal provided by the interaction of antigenic peptide/Major Histocompatibility Complex (MHC) with the TCR and a second signal, provided by the interaction of costimulatory molecules of Antigen Presenting Cell (APC) with CD28 of T cell [11]. The costimulation can be stimulatory or inhibitory; this depends on the receptor [12]. Interaction of CD28 by B7 molecules is necessary for the optimal clonal expansion of naive T cells. CD28-dependent costimulation of activated T cells induces expression of IL-2 and the high-affinity IL-2 receptor. Activating of naive T cells induces the surface expression of CTLA-4, another receptor for B7 molecules that binds B7 molecules with a higher affinity as compared to CD28, but its effect is to inhibit, rather than activate the T cell [13]. This is essential for limiting the proliferative response of activated T cell. TCR mediated activation of T cells in the absence of costimulation results in anergy [11]. The B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway is known to be critical for immune response initiation and regulation. Regulatory CD4 T cells express high levels of CTLA-4, and they are involved in controlling adaptive immune responses [14].

Costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86), which can be performed in neutrophilic granules, can be expressed in the surface under certain stimuli. Sandilands et al. describe cytoplasmic reservoirs of molecules B7: CD80 mainly within secretory vesicles and CD86 within secondary, azurophilic granules and secretory vesicles [15]. As mentioned before, NETs contain granular, nuclear and cytoplasmic elements. If costimulatory molecules CD80 and CD86 are in the neutrophil granules, may they be part of NETs? Interestingly, we found CD80 and CD86 colocalized in NETs in autologous leukocytes cultures, after lipopolysaccharide (LPS) or ovalbumin (OVA) stimulation. We stained for NE to visualize NETs. A preliminary experiment with immunological synapses in MLRs was performed to assess potential functional relevance of CD80 and CD86 colocalized in NETs (Figure 1). Further assays to evaluation of T cell responses are necessary [16].



**Figure 1:** PMN neutrophil contains granules and secretory vesicles. Generation of NETs in autologous leukocytes cultures, stimulated with lipopolysaccharide (LPS) or ovalbumin (OVA). This would allow PMNs to exert function as APCs and modulatory functions of various subpopulations of T cells (effector, naive, memory, regulatory T cells). The presence of CD80 and CD86 in NETs could influence the cell environment through the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway.

The presence of costimulatory molecules in NETs would let them influence the cell environment [16]. This finding could have relevance for a break in immune tolerance mediated by NETs. Different immunomodulatory actions could be triggered by activation B7-1(CD80)/B7- 2(CD86)-CD28/CTLA-4 pathway, resulting in stimulation, inhibition or anergy of different naive, memory and effector T lymphocyte populations. In this way, the possibility of acquiring competence to be APC by neutrophils with costimulatory molecules in NETs could link the innate and adaptive responses. These findings could also be relevant for a break in immune tolerance. Likewise, the different cell interactions and secreted cytokines also have an influence in the generation of different profiles of

proinflammatory or anti-inflammatory neutrophils. We can conclude that neutrophils could play an important role in immunomodulation.

Future research regarding the impact of NETs on the role of T cells must be performed. These new findings with the topics discussed in this communication could be the target of new therapeutic strategies in diseases where NETs and the different subpopulations of lymphocytes T are pathophysiologically responsible.

## Acknowledgements

We thank Professor Ana M. Granata for language editing of the work.

## References

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
2. Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159-175.
3. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191: 677-691.
4. Brinkmann V, Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198: 773-783.
5. Barrientos L, Marin-Esteban V, De Chaisemartin L, Lievin Le-Moal V, Sandré C, et al. (2013) An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* 4:166.
6. Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, Kühn L, Ben-Ezra J, et al. (2013) A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol* 4:48.
7. Schorn C, Janko C, Krenn V, Zhao Y, Munoz LE, et al. (2012) Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front Immunol* 3: 376.
8. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M (2012) T Lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 188: 3150-3159.
9. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11: 211-216.
10. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzam M, et al. (1987) A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328:267-270.
11. Sharpe AH (2009) Mechanisms of Costimulation. *Immunol Rev* 229: 5-11.
12. Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13: 227-242.
13. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, et al. (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174: 561-569.
14. Hou TZ, Qureshi OS, Wang CJ, Baker J, Young SP, et al. (2015) A transendocytosis model of CTLA-4 function predicts its suppressive behavior on regulatory T cells. *J Immunol* 194: 2148-2159.
15. Sandilands GP, McCrae J, Hill K, Perry M, Baxter D (2006) Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* 119: 562-571.
16. Rodriguez FM, Novak ITC (2016) Costimulatory molecules CD80 and CD86 colocalized in neutrophil extracellular traps (NETs). *J Immunol Infect Dis* 3:103.

# What about the neutrophils phenotypes?

Fernando Marcos Rodriguez<sup>1</sup> and Ivon Teresa Clara Novak<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology, Faculty of Medical Sciences, National University of Cordoba, Argentina

## Abstract

Human neutrophils are in the sights of immunology, since recent research has positioned them as new players in adaptive immunity besides innate immunity. These leukocytes not only limit their function to phagocytosis, production of reactive oxygen species and generation of neutrophil extracellular traps, but also modulate the immune response according to the microenvironment and the cell-cell interactions, such as interactions between neutrophils, T cells and macrophages. This review summarizes current polymorphonuclear neutrophils research on some phenotypes in scientific literature in murine and human models.

## Introduction

Polymorphonuclear (PMN) neutrophils are leukocytes that not only limit their function to phagocytosis, production of reactive oxygen species (ROS) and generation of neutrophil extracellular traps (NETs), but also modulate the immune response according to the microenvironment where they are and according to the interaction they establish with others cell types. Neutrophils have a role in the activation and regulation of innate and adaptive immunity [1]. The variability of its functions according to its environment, physiological or pathological condition, and the expression of different surface markers have allowed to characterize different profiles of neutrophils in murine and human models.

## Interaction between neutrophils, macrophages and T cells

In relation to the interaction between neutrophils and macrophages, PMNs contribute to the activation and recruitment of macrophages at the site of infection or in acute inflammation [2]. There is evidence of the existence of “proinflammatory” and “anti-inflammatory” neutrophil subsets that show a unique pattern of cytokine and chemokine production and they differ in receptor expression. It is possible that these “proinflammatory” and “anti-inflammatory” forms of neutrophils change the course of the immune response by inducing M1 or classically activated macrophages and M2 alternatively activated, respectively [3].

About possible interactions between T cells and neutrophils, the cytokines IL17A, IL17F secreted by Th17 cells (which play a prominent role in the immunity against extracellular bacteria and mycotic infections and have also been related to autoimmune phenomena) induce a rapid and massive infiltration of the affected tissue by the neutrophils. Reciprocally PMNs release of chemokines that attract T lymphocytes to the inflammation sites [4-6] and also cytokines that influence differentiation and proliferation of T cells [7-9]. Interestingly, a subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell functions through Mac-1 [10]. PMN neutrophils can release extracellular traps (NETs) which trap and kill a variety of microbes, and they have been proposed with role in T cell sensitization (9). NETs have been implicated in cancer immunoediting [11]. This NETs are composed of chromatin, histone and granule proteins [12,13]. Recently

has been reported costimulatory molecules CD80 and CD86 colocalized in NETs [14,15]. This finding would allow PMNs to exert function as APCs and modulatory functions of various subpopulations of T cells. Neutrophils and Th17 cells have been colocalized in tissues of the gut of patients with Crohn’s disease and in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, in tissues isolated from patients with asthma and in tissues infected with *Helicobacter pylori* [2]. Neutrophils isolated from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express Class II Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules [16].

Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules are observed on in vitro and in vivo activated human PMN neutrophils [17]. Cytoplasmic reservoirs of costimulatory molecules B7: CD80 mainly within secretory vesicles and CD86 within secondary, azurophilic granules and secretory vesicles were described [17].

The initiation of adaptive immune responses requires the fundamental stage of antigen presentation to T lymphocytes and currently the area of contact between T cell and an antigen presenting cell is known as “immune synapse” (SI) [18-20]. In murine models, neutrophil differentiation to a hybrid cell population exhibiting a dual phenotype with neutrophil and dendritic cell function [21] was experimentally described. Other authors demonstrated Class II restricted antigens presentation [22,23]. Although some neutrophils have been described at sites of inflammation expressing MHC Class II molecules and T-cell costimulatory molecules in mice and humans, their origin, phenotype and function remain unclear [24].

It is known that PMN neutrophils are considered short-lived cells in humans, but in inflammation, they increase its longevity. In vitro studies on leukocyte interactions in samples from patients with serology positive for Chagas’ disease, the extension of its longevity in cell culture was observed [25]. Recently has been reported costimulatory

**Correspondence to:** Novak ITC, Institute of Cell Biology, Faculty of Medical Sciences, National University of Cordoba, Argentina, Tel: 00 54 351 433 4020; E-mail: inovak@cmefcm.uncor.edu

**Key words:** neutrophil phenotypes, polymorphonuclear neutrophil, leukocytes

**Received:** May 14, 2017; **Accepted:** May 29, 2017; **Published:** May 31, 2017

**Table 1.** Characteristics of phenotypes of PMN neutrophils.

Reference	Phenotypes	Specie	Characteristics
Iking-Konert, <i>et al.</i> [29]	PMN MHC II (+) CD80+, CD86+	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>Patients with Wegener's Granulomatosis</li> <li>5 to 20% of neutrophils are larger and granular, expressing CD80, CD86 and MHC II</li> <li>Acquire characteristics of antigen presenting cells</li> <li>Patients with clinically inactive disease, with low levels of MHC II and CD80 expression</li> <li>High expression of CD86 regardless of disease activity</li> <li>CD64 Expression</li> <li>PMN MHC II (+) and autologous T cells co-cultured with antigen showed significant T cell proliferation</li> </ul>
Cross, <i>et al.</i> [16]	SF neutrophils	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>Patients with rheumatoid arthritis (RA)</li> <li>synovial fluid (SF) neutrophils express class II MHC.</li> <li>MHC II expression in synovial fluid (SF) neutrophils in cultures of 20 h, Blood neutrophil cultures from RA patients also expressed MHC II</li> <li>8-fold more MHC II expression in synovial fluid neutrophils of patients with RA, in the presence or absence of GM-CSF or IFN-gamma</li> <li>CD80 or CD86 expression does not increase significantly</li> </ul>
Tsuda, <i>et al.</i> [30]		Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>PMN subsets distinguished according to their (A) cytokine and chemokine production, (B) activation of macrophages, (C) TLRs expression, (D) surface antigen expression</li> <li>PMN-N can be converted to PMN-I or PMN-II depending on host circumstances</li> </ul>
	PMN-N	Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtained from naive mice</li> <li>No effect on macrophage activation</li> <li>TLRs expression: TLR-2, TLR-4, TLR-9</li> <li>surface antigen expression CD49d (-), CD11b (-)</li> </ul>
	PMN-I	Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtained from methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> resistant hosts</li> <li>IL-12, CCL3 production</li> <li>macrophage activation: Classically activated macrophages</li> <li>TLRs expression: TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-8</li> <li>surface antigen expression CD49d (+), CD11b (-)</li> </ul>
	PMN-II	Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtained from methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> sensitive hosts</li> <li>IL-10, CCL2 production</li> <li>macrophage activation: Alternatively activated macrophages</li> <li>TLRs expression: TLR-4, TLR-7, TLR-9</li> <li>surface antigen expression: CD49d (-), CD11b (+)</li> </ul>
Sandilands, <i>et al.</i> [31]	Neutrophils P1, after CD11b-cross linking	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>MHC II increases its expression at 2-5 min</li> <li>CD80 and CD86 do not significantly increase their expression</li> </ul>
	Neutrophils P2, after CD11b-cross linking	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increase in cell size</li> <li>High level of expression of neutrophil activation marker CD64</li> <li>CD80, CD86 and HLA-DR significantly increase their expression. CD86 does it at 120 minutes</li> <li>Express significantly elevated levels of MHC II, its expression is comparable to the levels expressed in monocytes</li> <li>CD80, its expression is significantly high compared to that of monocytes</li> </ul>
Sandilands, <i>et al.</i> [17]	Neutrophils P1,	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>After stimulation with phorbol myristate acetate (PMA), CD11b-cross linking, lipopolysaccharide (LPS), formylated peptides (fMLP)</li> <li>Smaller PMNs</li> <li>CD80 significantly increases expression after cross linking</li> <li>CD86 significantly increases expression</li> <li>Without stimulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA) PMNs P1 were observed, but not in paired blood samples. Increase in cell-surface CD66 expression</li> </ul>
	Neutrophils P2,	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>After stimulation with PMA, CD11b-cross linking, LPS, fMLP</li> <li>Larger PMNs</li> <li>The phenotype is observed in different percentage according to the activator: <ul style="list-style-type: none"> <li>- PMA 50%</li> <li>- Cross linking 20%</li> <li>- LPS 24%</li> <li>- fMLP 16%</li> <li>- Not activated 1%</li> </ul> </li> <li>MHC II and CD80 increase significantly</li> <li>CD86 increases significantly</li> <li>Without stimulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA) PMNs P2 were observed, but not in paired blood samples. Increase in cell-surface CD66 expression</li> </ul>
Culshaw, <i>et al.</i> [22]		Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Murine neutrophils expressed MHC II at low concentrations compared to macrophages</li> <li>Neutrophils pulsed with OVA323-339 for 2 hrs, then co-cultured with transgenic T lymphocytes for 72 h, induced T-cell proliferation and IL-2 and IFN-gamma production</li> <li>Murine neutrophils present Class II restricted antigen</li> </ul>

Hacbarth and Kajdacsy-Balla, [32] Denny, <i>et al.</i> [33] Carmona-Rivera and Kaplan, [34]	Low density granulocytes (LDGs) Low density neutrophils	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in PBMCs</li> <li>• isolated from the peripheral blood mononuclear cell fractions, in SLE</li> <li>• High expression of CD15 (to differentiate from monocytes)</li> <li>• Low expression of CD14 (to differentiate from monocytes)</li> <li>• Express CD10 and CD16</li> <li>• Do not express MHC II and CD86</li> <li>• Express surface markers similar to mature PMN</li> <li>• They differ in nuclear morphology that is consistent with immature phenotype</li> <li>• Proinflammatory profile: <ul style="list-style-type: none"> <li>- High secretion of TNF, IFN I and II</li> <li>- High ability to generate NETs</li> </ul> </li> </ul>
Abi Abdallah, <i>et al.</i> [35]		Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrophils co-cultured with purified CD4 T cells, expressed MHC II, CD80, CD86</li> <li>• PMN preincubated with OVA, triggered T-cell proliferation</li> <li>• PMN-pulsed with OVA, increase IFN-gamma and IL-17 production by cocultured T cells</li> </ul>
Clemmensen, <i>et al.</i> [36]	PMN OLFM4(+)	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• First identification of subset of human neutrophils based on the presence or absence of granule matrix protein.</li> <li>• OLFM4 suggested in interacting with Cathepsin C</li> <li>• OLFM4 is expressed heterogeneously in circulating neutrophils 20-25%</li> <li>• OLFM4 colocalizes with <ul style="list-style-type: none"> <li>- NGAL (azurophilic granules)</li> </ul> </li> <li>• Do not colocalize with MPO</li> <li>• OLFM4 appears in myelocytes</li> </ul>
Ostanin, <i>et al.</i> [23]	Neutrophils Gr-1+	Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• In mice with chronic colitis</li> <li>• Presence of mature and immature neutrophils Mac-1<sup>+</sup>, Ly6C<sup>int</sup>, Gr-1<sup>+</sup></li> <li>• Expression of CD86, MHC II in neutrophils of colon</li> <li>• Neutrophils induce T cell activation in a dependent MHC II manner</li> </ul>
Cloke, <i>et al.</i> [37]	Low density granulocytes (LDGs)	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Study in HIV patients (+)</li> <li>• They are colocalized with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and no in fraction of red blood cells</li> <li>• They express different levels of phenotypic markers of neutrophils: increased levels of CD11b, CD15, CD33, CD66b, CD63, and decreased levels of CD16 and arginase 1.</li> <li>• They increase their frequency in patients with low number of CD4 T cells-</li> <li>• Express Arginase, CD15</li> <li>• No express CD14</li> </ul>
	Normal density granulocytes (NDGs)	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sediment with red blood cells</li> <li>• Phenotype varies according to the severity of the disease.</li> </ul>
Welin, <i>et al.</i> [38]	Neutrophil OLFM4(+)	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OLFM4 up regulation in tumorigenesis</li> <li>• PMN OLFM4 (+) represent 10-30% of the circulating PMNs</li> <li>• There is no functional difference between PMN OLFM4 (+) and (-)</li> <li>• The subset OLFM4 (+) is also found in tissues, generally more activated than in blood</li> <li>• They also generate NETs and OLFM4 is detected in them</li> </ul>
Matsushima, <i>et al.</i> [21]	Neutrophil-dendritic cell	Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrophils cultured with GM-CSF</li> <li>• Hybrid cells expressing PMN surface markers <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ly6G</li> <li>- L-selectin</li> <li>- CXCR2</li> </ul> </li> <li>• And express surface markers of dendritic cells <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD11c</li> <li>- MHC II</li> <li>- CD80</li> <li>- CD86</li> </ul> </li> <li>• Exhibit functionality as APC and release IL-12</li> <li>• Preserve phagocytic function and release of NETs</li> </ul>
Geng, <i>et al.</i> [24]	Neutrophil-dendritic cell	Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrophils cultured with GM-CSF</li> <li>• Neutrophils detected in inflammatory conditions in the peritoneal cavity, skin, lung and lymph nodes</li> <li>• Hybrid cells expressing PMN surface markers <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ly6G</li> <li>- L-selectin</li> <li>- CXCR2</li> </ul> </li> <li>• And express surface markers of dendritic cells <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD11c</li> <li>- MHC II</li> <li>- CD80</li> <li>- CD86</li> </ul> </li> <li>• Exhibit functionality as APC and release IL-12</li> <li>• Preserve phagocytic function and release of NETs</li> </ul>

Hao, <i>et al.</i> [39]	Immune suppressive neutrophils	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suppressor myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have been identified as tumor suppressor</li> <li>• They represent heterogeneous family of myeloid cells that suppress T cell activation</li> <li>• Immunophenotype <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD11c bright</li> <li>- CD62L dim</li> <li>- CD11b bright</li> <li>- CD16 bright</li> </ul> </li> <li>• These PMNs could be essential for limiting T cell activation and maintaining tolerance in inflammatory conditions</li> </ul>
Davey, <i>et al.</i> [40]	PMN antigen cross presenting cell	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cross talk between PMN and gamma delta T cells and invariant mucosal associated T cells (MAIT) were studied in vitro</li> <li>• PMN primed with unconventional T cells expressed <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD40</li> <li>- CD64</li> <li>- CD83</li> <li>- HLA-DR</li> <li>- CD54</li> <li>- HLA ABC</li> </ul> </li> <li>• As well as indicators of inflammation <ul style="list-style-type: none"> <li>- CXCR3</li> <li>- CCR4</li> </ul> </li> <li>• Unconventional T cell primed PMN cross-present antigens to CD8+ T cells.</li> </ul>
Amsalem, <i>et al.</i> [41]	Decidual neutrophils	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proangiogenic granulocytes</li> <li>• They express high levels of activation markers and proteins related to angiogenesis <ul style="list-style-type: none"> <li>- VEGF A</li> <li>- ARG 1</li> <li>- CCL2</li> </ul> </li> <li>• Similar to PMNs associated with tumors</li> <li>• A significantly increased proportion of CD45+ CD15+ neutrophils was present in second trimester decidua compared with first trimester decidua.</li> </ul>
Ssemaganda, <i>et al.</i> [42]		Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Study in pregnant women</li> </ul>
	NDGs	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• They are found in maternal blood and umbilical cord at the time of parturition</li> <li>• They are not in term placenta</li> <li>• NDGs with high expression of Arginase in maternal blood and umbilical cord compared to LDGs</li> <li>• Low expression of CD63 (azurophilic granule release marker) compared to LDGs</li> <li>• NDGs of maternal blood and umbilical cord with similar phenotype</li> </ul>
	LDGs	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• They are found in maternal blood, placenta and umbilical cord</li> <li>• Low expression of Arginase in LDGs of umbilical cord blood, maternal blood and placenta</li> <li>• LDGs with high expression of CD33 (marker of immature neutrophils) in placenta, maternal blood and umbilical cord</li> <li>• High expression of CD63, CD15 (expressed by mature neutrophils) and CD66b</li> <li>• No phenotypic differences in the LDGs of the 3 compartments, except CD66b, with less expression in placental LDGs compared to those of maternal blood and umbilical cord</li> <li>• Higher frequency of LDGs in umbilical cord blood compared to placenta and maternal blood</li> </ul>
Fine, <i>et al.</i> [43]	Parainflammatory neutrophils "Para1"	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrophils of the oral cavity in state of health</li> <li>• Size and granularity profile similar to circulating neutrophils</li> <li>• Low ROS and NETs production compared to Para2</li> </ul>
	Parainflammatory neutrophils "Para2"	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased degranulation</li> <li>• High expression of activation markers <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD55</li> <li>- CD63</li> </ul> </li> <li>• Low expression of inhibitory markers <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD170</li> <li>- CD16</li> </ul> </li> </ul>
	Proinflammatory neutrophils	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased degranulation</li> <li>• They produce more ROS than parainflammatory</li> <li>• Size and granularity profile similar to Para2</li> <li>• Produce more NETs</li> <li>• High expression of activated CD</li> </ul>
Rodriguez and Novak, 2016 [14]		Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PMN stimulated with LPS and OVA</li> <li>• Costimulatory molecules CD80 and CD86 colocalized in NETs</li> </ul>
Wang <i>et al.</i> , 2017 [44]	Neutrophils PD- L1+	Human	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumor associated neutrophils</li> <li>• Human gastric cancer</li> <li>• CD54+</li> <li>• high level immunosuppressive molecule programmed death-ligand 1 (PD-L1).</li> <li>• Tumour-infiltrating PD-L1+ neutrophils exhibit immunosuppressive function and are correlated with disease stage and poor patient survival</li> </ul>

Zou, et al. 2017 [45]	Neutrophils N2	Mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-35 induces N2 PMNs</li> <li>• Protumor phenotype</li> <li>• Proangiogenic and immunosuppressive functions</li> <li>• Increased expression of MMP-9 and Bv-8</li> <li>• Decreased expression of TRAIL</li> </ul>
-----------------------	----------------	------	---

molecules and extracellular traps in patients with serology positive for Chagas' disease and that was related with autoimmunity phenomena [26]. Suppressive IL-10-producing neutrophils were found in this parasitosis in a murine model, reducing inflammation and mortality during T. cruzi infection through IL17RA-signaling [27].

About of the role of PMNs in tumor development, polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) was reported. "N1" phenotype (anti-tumorigenic) express higher levels of proinflammatory cytokines, they are hypersegmented, and cytotoxic to tumor cells. TGF- $\beta$  presence defines differentiation toward "N2" phenotype (pro-tumorigenic) [28].

This review attempts to synthesize the characteristics of PMN neutrophils, from some phenotypes observed in scientific works (Table 1).

## Conclusion

Neutrophils are very interesting cells implicated in innate and adaptive immunity. There are many described phenotypes of PMN neutrophils, but there are heterogeneous descriptions in literature, because parameters, methods, specie, tissue, biomarkers, are different. Anyway, these studies are very useful in the context of the one developed avoiding the extrapolation.

## Acknowledgments

To all authors of reviewed literature

## Disclosure statement

There is no conflict interest for this manuscript.

## References

- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*11: 519-531.[Crossref]
- Kumar V, Sharma A (2010) Neutrophils: cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*10: 1325-1334.
- Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*13: 159-175.[Crossref]
- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, et al. (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177: 195-203.[Crossref]
- Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch G M (2009) Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms. *Trends Immunol*30:522-530.
- Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, et al. (2010) Evidence for cross-talk between human neutrophils and Th17 cell. *Blood* 115: 335-343.
- Denkers EY, Del Rio L, Bennouna S (2003) Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *ChemImmunol Allergy*83: 95-114.
- Thewissen M, Damoiseaux J, van de Gaar J, Tervaert JW (2011) Neutrophils and T cells: bidirectional effects and functional interferences. *MollImmunol*48: 2094-2101.[Crossref]
- Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M (2012) T Lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol*188:3150-3159.
- Janesh P, Kamp VM, Hoffer EV, Visser E, Tak T, et al. (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*122:327-336.
- Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, Kühn LI, Ben-Ezra J, et al. (2013) A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol*4: 48.[Crossref]
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
- Brinkmann V, Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*198: 773-783.[Crossref]
- Rodríguez FM, Novak ITC (2016) Costimulatory molecules CD80 and CD86 colocalized in Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *J Immunol Infect Dis*3: 103.
- Rodríguez FM, Novak ITC (2016) May NETs Contain Costimulatory Molecules. *J Immunobiol*1:4.
- Cross A, Bucknall RC, Cassatella MA, Edwards SW, Moots RJ (2003) Synovial Fluid Neutrophils Transcribe and Express Class II Major Histocompatibility Complex Molecules in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*48: 2796-2806.
- Sandilands GP, McCrae J, Hill K, Perry M, Baxter D (2006) Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* 119: 562-571.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, et al. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*285: 221-227.
- Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, et al. (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol*19: 375-396.[Crossref]
- Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, et al. (2002) T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*295: 1539-1542.
- Matsushima H, Geng S, Lu R, Okamoto T, Yao Y, et al. (2013) Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* 121: 1677-1689.
- Culshaw S, Millington OR, Brewer JM, McInnes IB (2008) Murine neutrophils present Class II restricted antigen. *Immunol Lett*118: 49-54.
- Ostanin DV, Kurmaeva E, Furr K, Bao R, Hoffman J, et al. (2012) Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *J Immunol*188: 1491-1502.
- Geng S, Matsushima H, Okamoto T, Yao Y, Lu R, et al. (2013) Emergence, origin, and function of neutrophil-dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. *Blood* 121: 1690-1700.
- Rodríguez FM, Orquera AD, Maturano MR, Infante NS, CarabajalMiotti C, et al. (2016) Human neutrophils in patients with positive serology for Chagas disease. *J Immunol Infect Dis* 3: 101-108.
- Rodríguez FM, Vargas A, CarabajalMiotti C, González Silva N, Ruiz de Frattari, et al. (2017) Extracellular Traps and costimulatory molecules in leukocytes of patients with positive serology for Chagas disease. *MOJ Immunol*5:00163.
- Tosello-Boari J, Vesely MCA, Bermejo DA (2012) IL-17RA Signaling Reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoSPathog*8:e1002658.
- Fridlender Zvi G, Jing Sun, Samuel Kim, Veena Kapoor, Guanjun Cheng, et al. (2009) Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- $\beta$ : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16: 183-194.
- Iking-Konert C, Vogt S, Radsak M, Wagner C, Hänsch GM, et al. (2001) Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int*60: 2247-2262.
- Yasuhiro T, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, et al. (2004) Three Different Neutrophil Subsets Exhibited in Mice with Different Susceptibilities to Infection by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Immunity* 21: 215-226.
- Sandilands GP, Ahmed Z, Perry N, Davison M, Lupton A, et al. (2005) Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology* 114: 354-368.
- Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A (1986) Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum*29:1334-1342.
- Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, et al (2010) A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol*184:3284-3297.



34. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ (2013) Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol*35: 455-463
35. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY (2011) Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*23: 317-326.
36. Clemmensen SN, Bohr CT, Rorvig S, Glenthøj A, Mora-Jensen H, et al. (2012) Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *J Leukoc Biol*91: 495-500.
37. Cloke T, Munder M, Bergin P, Herath S, Modolell M, et al. (2013) Phenotypic Alteration of Neutrophils in the Blood of HIV Seropositive Patients. *PLoS One*8: 1-7.
38. Welin A, Amirbeagi F, Christenson K, Björkman L, Björnsdóttir H, et al. (2013) The Human Neutrophil Subsets Defined by the Presence or Absence of OLFM4 Both Transmigrate into Tissue In Vivo and Give Rise to Distinct NETs In Vitro. *PLoS One*8: 1-13.
39. Hao S, Andersen M, Yu H (2013) Detection of immune suppressive neutrophils in peripheral blood samples of cancer patients. *Am J Blood Res*3: 239-245.
40. Davey MS, Morgan MP, Liuzzi AR, Tyler CJ, Khan MWA, et al. (2014) Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells. *J Immunol*193: 3704-3716.
41. Amsalem H, Kwan M, Hazan A, Zhang J, Jones RL, et al. (2014) Identification of a novel neutrophil population: proangiogenic granulocytes in second-trimester human decidua. *J Immunol*193: 3070-3079.
42. Ssemaganda A, Kindinger L, Bergin P, Nielsen L, Mpendo J, et al. (2014) Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS One*9:e85696.
43. Fine N, Hassanpour S, Borenstein A, Sima C, Oveisi M, et al. (2016) Distinct Oral Neutrophil Subsets Define Health and Periodontal Disease States. *J Dent Res*95: 931-938.
44. Wang TT, Zhao YL, Peng LS, Chen N, Chen W, et al. (2017) Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut*.
45. Zou JM, Qin J, Li YC, Wang Y, Li D, et al. (2017) IL-35 induces N2 phenotype of neutrophils to promote tumor growth. *Oncotarget*8: 33501-33514.[[Crossref](#)]